

THESIS

MUNICH

1967

Das Verhalten der Phosphatide und ihrer
Fettsäuren in der Rattenleber
nach einer letalen Ganzkörperbestrahlung

Rudolf Hartung

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. SEITZ

DAS VERHALTEN DER PHOSPHATIDE UND IHRER FETTSÄUREN IN DER
RATTENLEBER NACH EINER LETALEN GANZKÖRPERBESTRAHLUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rudolf H a r t u n g
aus München

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. W. SEITZ

Dekan: Professor Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 3. 1967

Meinen Eltern in Dankbarkeit
gewidmet

INHALT

EINLEITUNG	7
Die radiochemische Reaktionskette	7
Strahleneffekte bei den Lipoiden	8
Verteilung und biologische Bedeutung der Phosphatide in der Leber	10
Strahlenbedingte Veränderung der Leber	12
PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
BESCHREIBUNG DER VERSUCHE	16
Bestrahlung der Tiere	16
Gewinnung der Leberlipide	16
Isolierung der Phosphatidfraktion	18
Darstellung der Phosphatidfettsäuren	20
Gaschromatographische Untersuchung der Phosphatidfettsäuren	20
Spektroskopische Untersuchung der mehrfach ungesättigten Phosphatidfettsäuren	22
Reagenzien	27
ERGEBNISSE UND DISKUSSION	28
ZUSAMMENFASSUNG	44
TABELLARISCHER ANHANG	45
LITERATUR	48

EINLEITUNG

Die radiochemische Reaktionskette

Untersuchungen über die Wirkung ionisierender Strahlen im Säugetier-organismus richteten sich im Anfang auf die Bestimmung der unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit der Gewebe, wobei die Frage nach dem Aktionsmodus dieser Strahlen im Vordergrund stand. Das damalige Konzept entspricht im Prinzip noch unseren gegenwärtigen Vorstellungen. Demzufolge schließen sich an die primäre Wechselwirkung zwischen Strahlung und Materie verschiedene Zustände an, die sich folgendermaßen darstellen lassen (1):

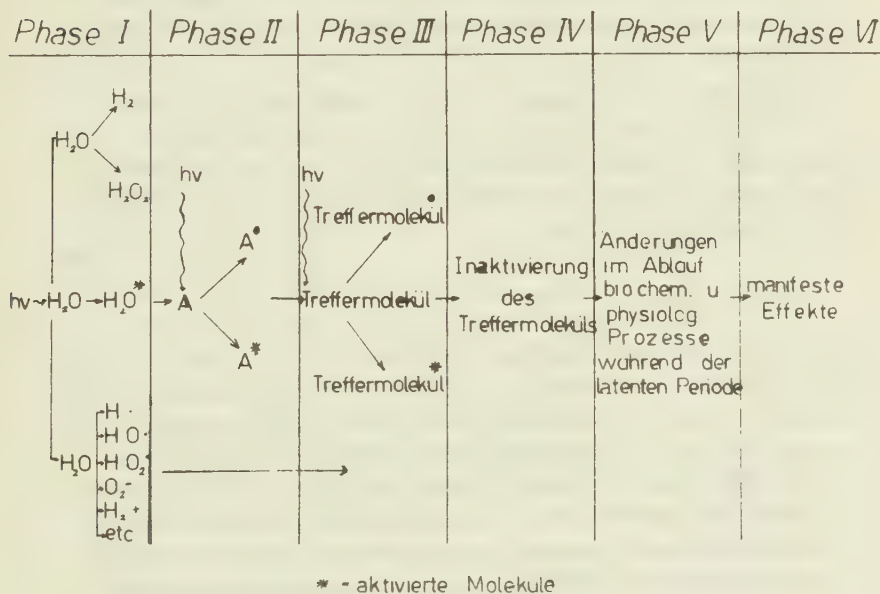


Abb. 1: Schematische Darstellung der Vorgänge nach Absorption von Strahlenenergie

1. Phase: Physikalische Phase. Erzeugung oder Durchgang geladener Partikel durch die molekulare Anordnung des bestrahlten Systems. Dauer 10^{-13} bis 10^{-18} Sek. (2) - Abb. 1 zeigt die Anregung eines Wassermoleküls und die dann entstehenden Folgeprodukte wie molekularer

Wasserstoff und Wasserstoffperoxyd sowie eine Reihe radikalischer Zustände.

2. Phase: Physiko-chemische Phase. Erzeugung instabiler chemischer Primärprodukte (Radikale, Ionen mit teilweise von der ursprünglichen Substanz abweichender Zusammensetzung). Dauer 10^{-8} bis 10^{-13} Sek.

(2) - Dies kann entweder durch den direkten Treffer eines Radikals oder durch Übertragung der Strahlungsenergie von den Radiolyseprodukten der ersten Phase auf das betreffende Molekül geschehen.

3. Phase: Chemische Phase. Reaktion der sehr reaktiven Primärprodukte mit den Moleküleinheiten der Umgebung unter Bildung stabiler Verbindungen. - Das aktivierte Treffermolekül kann, - je nach seiner chemischen Struktur - noch kürzere oder längere Zeit beständig bleiben.

4. Phase: Biologische Phase. Die stabilen Bestrahlungsprodukte der 3. Phase treten in Beziehung mit den biologischen Strukturen. Die dabei eintretenden chemischen Veränderungen führen zur Änderung in den biologischen Eigenschaften dieser Systeme.

5. und 6. Phase: In einfachen in vitro-Systemen kann das Ergebnis der 5. Phase gewöhnlich auf irgendeine Weise gemessen werden. In komplexen biologischen Systemen jedoch wird eine latente Periode eingeschaltet, während der biochemische Faktoren den endgültigen Strahlungseffekt bestimmen.

Strahlungseffekte bei den Lipoiden

Von diesen grundsätzlichen Vorstellungen aus lassen sich die biologisch-chemischen und schließlich die morphologischen Veränderungen ableiten, die zum Bild der Strahlenkrankheit führen. In den letzten Jahren wurden die Lipide und ihre Bestrahlungsprodukte in zunehmendem Maße bei der Entstehung dieses Syndroms diskutiert. - Als strahlenempfindlichste Bestandteile der Lipide müssen die esterartig gebundenen ungesättigten Fettsäuren angesehen werden. Bei aus therapeutischen Gründen mit γ -Strahlen behandelten Patienten zeigte sich ein Abfall besonders der ungesättigten Fettsäuren im Serum (3).

Auch bei in vitro-Versuchen (4) ergab sich eine Sensibilitätsabhängigkeit von der Ungesättigtheit der Substanzen. Die gesättigten Fettsäuren werden in nennenswertem Umfang erst durch verhältnismäßig hohe Strahlendosen verändert. Dabei kommt es in der Regel zu einer vollständigen oxydativen Aufspaltung der C-C-Bindung der Kohlenstoffkette unter Bildung niedermolekularer Carbonylverbindungen (5). Die ungesättigten Fettsäuren lassen sich demgegenüber bereits durch viel

geringeren Energieaufwand verändern. Angriffspunkt für radiochemische Reaktionen sind hier die C=C-Doppelbindungen. Als Bestrahlungsfolge kann es zu einer Verlagerung ihrer intramolekularen Lokalisation oder zu einer sterischen Umlagerung ihrer Konfiguration kommen. So zeigt MEAD (6) bereits 1952, daß durch Strahlendosen von 500r bei in wäßriger Lösung vorliegender Linolsäure Umlagerungen der isolierten, im Divinylmethanrhythmus ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) angeordneten all-cis-Doppelbindungen in konjugierte stattfinden, und PROKTOR und Mitarbeiter (7) berichteten 1958 über die cis-trans-Isomeren bei der Ölsäure nach Beschuß mit schnellen Elektronen. Der Effekt stand in Abhängigkeit von der angewandten Strahlendosis. HOWTON (8) versuchte die Bestrahlungsprodukte der Ölsäure näher zu charakterisieren und fand nach säulenchromatographischer Trennung neben unveränderter Ölsäure (Hauptanteil) und geringen Mengen anderer Reaktionsprodukte eine Dimerenfraktion mit unterschiedlichem Gehalt an Doppelbindungen und unterschiedlicher Vernetzungsart, die den größten Teil der entstandenen trans-Doppelbindungen enthielt. Als eine weitere Veränderung an Fettsäuren stellte H. LÜCK (9) fest, daß es bei der Bestrahlung von Fetten mit 100 Mrad Kathodenstrahlen zur Bildung kurzkettiger Fettsäuren durch Abspaltung der terminalen Methylgruppen kommt. Ferner zeigte sich eine Aufspaltung der in Kettenmitte befindlichen C-C-Bindungen, wobei die in Nachbarschaft zu Doppelbindungen befindlichen bevorzugt aufgebrochen wurden. Als Hauptkomponente wurden gesättigte und ungesättigte C_6 - bis C_{11} -Fragmente gefunden. Nach WEISS (10) wird für den Ablauf aller dieser Reaktionen ein radikalischer Mechanismus angenommen. HOWTON (8) hat in diesem Sinne die Entstehung der aus der bestrahlten wäßrigen Ölsäurelösung isolierten Produkte interpretiert. Danach reagieren die Radiolyseprodukte des Wassers mit den Doppelbindungen entweder unter Ausbildung radikalischer Zwischenprodukte durch $\cdot\text{H}$ - oder $\cdot\text{OH}$ -Anlagerung, oder sie führen zu der resonanzstabilisierten Struktur $-\text{CH}\cdot\cdot\text{CH}\cdot\cdot\text{CH}-$, die sich ihrerseits in verschiedener Weise umsetzen kann.

Enthält das bestrahlte System Sauerstoff, so kommt es zur Reaktion desselben mit den aktivierten Fettsäure-Strukturen, also zu einer Oxydation der ungesättigten Fettsäuren, z. B. zu den Lipoperoxyden mit der charakteristischen Gruppierung $-\text{O}\cdot\text{OH}$. Verbindungen dieses Types aber sind toxische Stoffe für den tierischen Organismus, indem sie z. B. denaturierend oder inaktivierend auf Serumeiweißstoffe (11) und Fermente (12) einwirken, und es wurde die Frage aufgeworfen, ob die Strahlenkrankheit wenigstens teilweise durch das Auftreten derartiger Substanzen im Gewebe bedingt ist. In der Tat lassen sich derartige Peroxyde in erhöhten Konzentrationen in den Lipoiden bestrahlter Mäuse

nachweisen (13). Weiterhin ist daran zu denken, daß durch diese Vorgänge dem Organismus die möglicherweise als Radikalfänger wichtigen Fettsäuren entzogen werden. Auftretende freie Radikale werden dann nicht mehr inaktiviert und können weitere Molekülveränderungen bedingen.

Auf die Kinetik der Lipoperoxydbildung bei in vitro-Bestrahlung von Fettsäuren, die sich nur hinsichtlich ihrer Ungesättigtheit unterscheiden, soll durch folgende Ergebnisse hingewiesen werden: Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde ein erstes Maximum dieser oxydierenden Verbindungen festgestellt, dessen Höhe von der Ungesättigtheit der Fettsäuren und der Strahlendosis abhing (4). 1/2 Stunde nach Bestrahlungsende ließen sich keine derartigen Produkte mehr nachweisen. Nach einer weiteren 1/2 Stunde hatte ihr Gehalt jedoch die ursprüngliche Höhe wieder erreicht, stieg aber anschließend im Laufe der folgenden 24 bis 48 Stunden nur noch geringfügig weiter an.

Dieser in vitro-erfaßte 2-phasige Verlauf der toxischen Peroxyde läßt sich allerdings nicht so direkt auf biologische Verhältnisse übertragen. In vivo ist nämlich gleichzeitig in Erwägung zu ziehen, daß die derartig veränderten Moleküle ihre natürliche biologische Funktion nicht mehr erfüllen können, daß also die Systeme, in denen sie eingebaut sind, nicht mehr voll funktionsfähig sind.

Verteilung und biologische Bedeutung der Phosphatide in der Leber

Wollen wir die beeinträchtigten Funktionen und morphologischen Veränderungen nach einer Bestrahlung betrachten, so gilt es zunächst, die Bedeutung der Phosphatide und ihrer Fettsäuren zu erläutern, um die es im Rahmen der vorliegenden Arbeit besonders geht. Die Phosphatide sind wesentliche Bestandteile aller membranösen Strukturen, wo man sie vielfach in Protein-Lipoid-Doppelschichten findet. Auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften bauen sie die elektrisch isolierenden Membranbrücken auf, während die Proteinanteile elektrisch leitend sind. Besonders reich an Glycerophosphatiden, sowie an Cerebrosiden und Gangliosiden ist das Nervengewebe.

Chemisch sind die Phosphatide Phosphorsäurediester; dabei ist die eine Säuregruppe der Phosphorsäure meist mit Glycerin oder N-Acylsphingosin, eine andere mit Cholin, Colamin, Serin oder Inosit verestert.

In den Mitochondrien der Rattenleber bestehen die Phosphatide in der Hauptsache aus Glycerophosphatiden, die sich nach GETZ (14) wie folgt zusammensetzen:

(In % der Gesamt-Lipoidphosphors)

Lezithin	39 %
Colamin-Serinkephalin	42 %
Polyglycerophosphatide	8 %
Inosithphosphatide	10 %
Lysophosphatide	3 %

Auf die besondere Bedeutung der Phosphatide in der Atmungskette wurde mehrfach hingewiesen (15, 16). So sind sie zur Elektronenübertragung von Succinat auf CoQ, von reduziertem CoQ auf Cytochrom c und von reduziertem Cytochrom c auf O_2 notwendig. Eine besondere Bedeutung für diese Funktionen kommt wahrscheinlich den Phosphatidfettsäuren und hier besonders den Polyenfettsäuren zu. Nach Untersuchungen von GREEN und FLEISCHER (Übersicht bei 17) sollen sie durch Einschaltung in das elektronenübertragende System an der Endoxydation und damit an der Bereitstellung von Energieträgern für endergone Prozesse teilnehmen. Dementsprechend kommen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in relativ hoher Konzentration in Organen vor, die einen beträchtlichen Sauerstoffumsatz aufweisen. So finden sie sich in großen Mengen in den Phosphatiden der Mitochondrien und Mikrosomen der Leber (s. Tab. I).

Tab. I: Die Fettsäurezusammensetzung in den Phospholipiden der Rattenlebermitochondrien in % der Gesamtfettsäuremethylester (18)

FETTSÄUREN NAME	BEZEICHNUNG	PHOSPHOLIPIDE, die hauptsächlich ETHANOLAMIN und SERIN enthalten		CHOLINPHOSPHATIDE		INOSIT- REICHE FRAKTION	CARDIOLIPIN
		REF. 1	REF. 2	REF. 1	REF. 2		
AURINSÄURE	12 : 0	0,4	-	-	0,1	-	-
MYRISTINSÄURE	14 : 0	-	0,1	0,3	0,5	0,9	0,5
HEXADEKANSÄURE	16 : 0	0,2	0,2	0,2	0,5	1,5	0,2
HEPTADEKANSÄURE	17 : 0	17,5	20,2	13,2	19,7	12,1	3,9
OKTADEKANSÄURE	18 : 0	1,0	0,8	3,5	1,5	0,8	2,5
NONADEKANSÄURE	19 : 0	0,6	0,9	0,6	0,8	1,4	0,1
EIKOSANSÄURE	20 : 0	30,4	19,5	21,9	18,7	32,0	1,4
HEIKOSANSÄURE	20 : 1	4,8	10,4	14,1	12,2	6,8	12,8
TRIKOSANSÄURE	21 : 0	4,3	16,3	19,6	20,0	16,2	74,0
TETRAKOSANSÄURE	24 : 0	0,8	0,7	1,5	0,8	1,8	1,2
PENTAKOSANSÄURE	25 : 0	21,0	21,0	13,8	19,5	21,5	1,6
HEXAKOSANSÄURE	26 : 0	2,4	-	1,9	0,6	-	-
HEPTAKOSANSÄURE	27 : 0	2,0	1,0	1,2	0,4	0,9	0,5
OKTAKOSANSÄURE	28 : 0	14,0	8,7	7,9	3,4	3,4	0,4

REF. 1 und 2 siehe (12)

Über die biologische Funktion der mehrfach ungesättigten Fettsäuren liegen einige Hinweise vor, z. B. bei der Cytochrom-Oxydase (19) und der D- β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase. Für letztere, ein Enzym, das nur sehr schwer aus Mitochondrienpartikeln zu dissoziieren ist, ist die Anwesenheit von Lecithin (und zusätzlich seines Elektronenakzeptors NAD) absolut erforderlich. Dieses Lecithin muß einen hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, denn gesättigtes Lecithin erweist sich als fast inaktiv (20). Ferner wird angenommen, daß die mehrfach ungesättigten Phosphatidfettsäuren zur Aufrechterhaltung der räumlichen Anordnung in den enzymatischen Wirkungszentren bzw. zur Einstellung der kritischen Dielektrizitätskonstanten erforderlich sind (21).

Ihre mögliche Bedeutung als Radikalfänger mag folgendes praktisches Beispiel zeigen. Sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch erwiesen sich ungesättigte Fettsäuren beim Strahlensyndrom als wirksam. Bei der Applikation von essentiellen Fettsäuren konnte die Häufigkeit des subakuten Strahlensyndroms bei Patienten von 30 % auf 5 % gesenkt werden (22). Im Tierversuch fand A. GREGL eine Erhöhung der Überlebensrate um 2 % (22). Über ein ähnliches Ergebnis berichtet MAQSOOD (23), der nach Gaben von Olivenöl bei ganzkörperbestrahlten Mäusen nach 30 Tagen eine Steigerung der Überlebensrate von 65 % feststellte. Es kam dabei vor allem zu einer beschleunigten Regeneration der hämopoetischen Organe; besonders der Gewichtsverlust von Milz und Thymus war nicht so ausgeprägt wie bei den Kontrolltieren. Allerdings sind diese Befunde auch widersprochen (24).

Strahlenbedingte Veränderungen in der Leber

Die Auswirkung einer Ganzkörperbestrahlung (GKB) wird sich hinsichtlich der Lipoide und hier speziell der Phosphatide in der Leber in doppelter Weise äußern. Einmal werden die strahlenbedingten Änderungen im Phosphatidmolekül zu einer morphologischen Änderung der Zellstrukturen führen, in die diese eingebaut sind, zum anderen wird ihr funktioneller Ausfall Störungen biologischer Reaktionsketten zur Folge haben. Dabei zeigt sich deutlich eine Relation zwischen angewandter Strahlendosis und dem Zeitpunkt des Auftretens morphologischer Änderungen. Alle folgenden Angaben beziehen sich auf eine Ganzkörperbestrahlung.

In dem hier interessierenden Dosisbereich kommt es bereits nach 30 Min. in den Leberzellen zu deutlichen Veränderungen (25 und 26). BRAUN (26) weist wiederholt auf eine mit der Dosis zunehmende Homogenisierung der ergogastoplasmatischen Grundsubstanz und auf eine zunehmende Vakuolisierung hin, ferner auf eine Verminderung des

Ergastoplasmas und auf eine Auftreibung lamellärer Strukturen. Die Mitochondrien zeigen Tendenz zur Klumpenbildung und liegen bei niedriger Strahlendosis bevorzugt in der Nähe des Zellkerns, bei höheren Dosen besonders an der Zellperipherie. Bei 800r sind die Größe und Struktur der Mitochondrien zunächst unverändert. 6 Stunden, besonders aber 12 Stunden nach dem Insult zeigt sich eine Abnahme des Durchmessers; viele schmale, langgestreckte Formen treten auf, die manches Mal in Bruckstücke zerfallen. Die wenigen Pro-Mitochondrien besitzen ebenfalls eine verdichtete Matrix. Außerdem erscheinen im Plasma Fettablagerungen in Form runder Herde. Nach 24 Stunden nehmen aufgequollene Formen mit abgebauter Innenstruktur besonders zu. Diese Schäden sowie Löcher und Defekte der Hüllmembranen sieht man nach einer GKB von 3200r schon viel früher (26). Zunächst ist zwar auch hier ihre Größe noch normal. Im Plasma und in den Vakuolen sind nach 6 Stunden reichlich Lipoideinschlüsse zu sehen. Nach 12 Stunden wird der Plasmasaum auffallend schmal, strukturierte Mitochondrien und Pro-Mitochondrien werden selten.

Trotz dieser bedeutenden morphologischen Veränderung der Feinstrukturen scheint deren chemischer Aufbau wie z. B. der der Mitochondrienmembranen zunächst wenig gestört. Ihre Lipide bestehen normalerweise aus 55 Mol% Kephalin, 34 Mol% Lezithin, 3 Mol% Cholesterin und 8 Mol% Glyceriden. Bezüglich dieser Hauptklassen lassen sich bei 1000r 40 Min. p. irr. keine Veränderungen feststellen, auch zeigt sich kein Abfall der ungesättigten Fettsäuren (27). Vielmehr wurde ein Anstieg des Linol- und Arachidonsäuregehaltes der Lezithinfraktion festgestellt.

Daraus erklärt sich wohl auch, daß die enzymatischen Leistungen zunächst nicht wesentlich betroffen sind. THOMSON und Mitarbeiter (28) sahen bei mit 1000r ganzkörperbestrahlten Ratten keinen Effekt auf der Basis der Enzymverteilung in den Mitochondrien, Lyosomen und Urikase-Partikeln der Leber. Bei isolierten Lebermitochondrien ausgewachsener Ratten hatte eine GKB keinen Effekt auf die Succinodehydrogenaseaktivität, demnach blieb die Oxydation zu Pyruvat unverändert (29). Zwar fand HALL (30) an isolierten Mitochondrien 3 bis 12 Stunden nach Bestrahlungsende die oxydative Phosphorylierung um ca. 25 % beeinträchtigt, nach 1 Tag jedoch lag sie wieder auf normaler Höhe. RYSER und Mitarbeiter (31) stellten ebenfalls bei 1000r eine signifikante Abnahme der oxydativen Phosphorylierung bei Ratten fest.

Im Gegensatz zu einer unveränderten oder abnehmenden Enzymaktivität stehen Literaturberichte, die nach einer GKB auf verstärkte Oxydationsvorgänge nach allerdings hochdosierter Bestrahlung hinweisen. So

konnte M. HÖFERT (32) an röntgen-bestrahlten Leberschnitten eine erhöhte Lichtemission (bis max. 10^4 Photonen/cm³ sec) feststellen. Daß diese Chemilumineszenz auf Oxydationsvorgängen beruht, bestätigt die Abnahme des Leuchtens bei O₂-Entzug (32). TARUSOV (33) fand bei Messungen dieser Lumineszenz Strahlungsmaxima zwischen 460 und 500 mμ. Nach seiner Feststellung ähnelt das Spektrum in erster Näherung dem Spektrum der Chemilumineszenz der oxydierenden Fette.

PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im Gegensatz zu vielen anderen Lipoiden sind die Phosphatide - vor allem in den Mitochondrien und Mikrosomen - als integrierte Membranbestandteile strukturgebunden. Sie bilden hier nicht nur einfach passiv räumliche Anordnungen zur Abgrenzung der Zellkompartements, sondern nehmen auch, wie bereits dargelegt, aktiv an Stoffwechselvorgängen teil. Dabei spielen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die in den Glycerophosphatiden meistens in hohen Konzentrationen enthalten sind, eine wichtige Rolle. Alle zur Zeit vorliegenden Befunde sprechen dafür, daß die Phosphatide erst dann bei chemischen Umsetzungen voll wirksam werden, wenn sie β -ständig eine mehrfach ungesättigte Fettsäure enthalten, in erster Linie also Arachidonsäure. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind essentielle Verbindungen, indem sie durch Kettenverlängerungs- und Dehydrierungsreaktionen aus der Linolsäure gebildet werden, die im tierischen Organismus nicht synthetisiert werden kann. Nur bei alimentärem Linolsäuremangel baut der Körper aus Ölsäure oder Stearinsäure eine 3-fach ungesättigte Fettsäure die Eikosatriensäure auf, die allerdings die biologischen Funktionen der eigentlichen mehrfach ungesättigten Fettsäuren nicht voll übernehmen kann, so daß es in solchen Fällen zu einem definierten Ausfallssyndrom kommt.

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden durch eine Strahleneinwirkung relativ leicht verändert, und es erhebt sich die Frage, ob es im Verlauf einer durch eine letale GKB bedingten Strahlenkrankheit zu einer erkennbaren Verringerung dieser Verbindungen in den Organen - hier in der Leber - kommt. Weiterhin interessierte am Verhalten der Gesamtposphatide, ob deren Gehalt sich gleichsinnig wie der Gehalt an den mehrfach ungesättigten Fettsäuren verhält. Eine solche Vermutung liegt nach dem Gesagten nahe, denn die Einwirkung ionisierender Strahlen führt bei Anwesenheit von Sauerstoff zur Lipoperoxydbildung; derartig veränderte Moleküle sind aber toxisch und müssen eliminiert werden. Da sich diese Vorgänge überall im Körper abspielen, sollte es zu einem wenigstens temporären Mangel an mehrfach ungesättigten Fettsäuren kommen, der vielleicht eine der Ursachen der strahlungsbedingten Stoffwechselschädigung ist.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Bestrahlung der Tiere

Zur Bestrahlung wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 200 - 250 g verwendet. Die Tiere wurden 14 Tage vor Versuchsbeginn mit Latz-Futter (fetthaltig) und Wasser ad libitum gefüttert. Jeweils zwei Tiere wurden gleichzeitig in einem Plexiglas-kasten, der mit nach Körpergröße verstellbaren Fächern eine Fixierung der Tiere erlaubte, einer Ganzkörperbestrahlung von 1500r ausgesetzt. Die Bestrahlung wurde mit einem Röntgengerät zur Tiefentherapie der Firma Siemens durchgeführt. Weitere Daten:

200 KV, 20 mA

0,3 mm Aluminiumfilter

Fokus - Herd - Abstand (FHA) = 15 cm

Bestrahlungsdauer ca. 4 Minuten

Die Strahlenmenge wurde simultan mit einer Fingerhuthionisationskammer der Firma Siemens gemessen. Bei den als Kontrollgruppen vorgesehenen Tieren wurde eine Scheinbestrahlung durchgeführt.

Gewinnung der Leberlipide

Je 5 Tiere wurden 0,5, 1, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Beendigung der Bestrahlung mit Äther narkotisiert. Nach Bestimmung des Körpergewichtes und nach Eröffnen des Abdomen und Thoraxraumes wurden sie durch einen Kreuzschnitt an der Herzspitze getötet. Die Kontrolltiere wurden nach 2 Stunden getötet; 10 Tiere gingen 60 Stunden nach dem Insult mit den Zeichen einer hämorrhagischen Diarrhoe ein. Die Lebern wurden entnommen und sofort auf Eis gelegt. Nach Bestimmung des Frischgewichtes wurden die Organe mit einem Messer-Homogenisator der Firma E. Bühler, Tübingen, fein püriert. Dabei wurde mehrmals Methanol-Chloroform 2 : 1 zugegeben und anschließend das Homogenisiergerät nach Ausschütten des dünnflüssigen Inhalts bis zum letzten Rest gesäubert, so daß die tatsächlich zum Versuch verwandte Gewichtsmenge der Leber gleich dem Frischgewicht gesetzt werden konnte.

Zur Extraktion der Lipide wurde nach der Methode von FOLCH, LEE und SLOANE-STANLEY gearbeitet (34). Das bereitete Leberhomogenat wurde in die Menge Chloroform-Methanol 2 : 1 unter Schütteln vor-

sichtig eingetroppt, die dem 20-fachen Gewicht des homogenisierten Organs entsprach. Zur vollständigen Fällung des Eiweißes und zur Extraktion der Lipide wurde dieses Gemisch einen Tag lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann wurde durch ein Faltenfilter (Schleicher und Schüll 595 1, 5 / 12, 5 cm) in einem Meßzylinder abfiltriert. Der Filtrerrückstand (= extrahierter Geweberückstand) wurde 12 Stunden bei 120° C getrocknet und nach weiterer 24-stündiger Exsikkator-Trocknung gewogen. Der Chloroform-Methanol-Extrakt mit den darin gelösten Lipiden wurde mit der 0, 2-fachen Menge seines Volumens Aqua dest. versetzt. Um die wasserlöslichen Lipide abzutrennen, wurde nun kräftig durchgeschüttelt und das Phasengemisch zur Trennung der Phasen in einen Scheidetrichter gegeben. Nach vollständiger Phasentrennung, die meist über Nacht bis spätestens nach einigen Tagen vollzogen war, wurde die untere Phase, die die Gesamtlipide enthielt, aus dem Scheidetrichter abgelassen, im Rundkolben mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei 40° C Wasserbadtemperatur und einem leichten, durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugten Vakuum eingedampft. Nach Überführen in ein Zentrifugenröhrchen mit angesetztem NS-Schliff wurde diese Gesamtlipoidphase erneut eingedampft. Die Überführung geschah jeweils nach Lösung des Verdampfungsrückstandes in Chloroform mit 2 bis 3-maliger Nachspülung des Rundkolbens. Alle folgenden Überführungen geschahen nach diesem Modus und werden deshalb nicht einzeln geschildert werden. Ergaben sich nach Abdampfen des Lösungsmittels noch Reste von Wasser, die möglicherweise bei der Phasentrennung in die untere Phase geraten waren, so wurden diese mit einigen ml Methanol abdestilliert. Die Röhrchen mit den eingedampften Gesamtlipiden wurden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann gewogen. Durch Abzug des vorher ermittelten Röhrchengewichtes ergab sich das Gewicht der Gesamtlipide. Nach der Wägung wurden sie in Chloroform gelöst, in Ampullen überführt und unter Stickstoff eingeschmolzen. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden sie bei etwa -5° C aufbewahrt.

Die obere wäßrige Phase, die nichtlipide-Extraktstoffe und nur 0, 3 % Lipide enthält, wurde in kleine Erlenmeyer-Kolben gegeben und nach Nachspülen des Scheidetrichters mit künstlicher oberer Phase (nach FOLCH) auf einer Heizplatte eingedampft. Darauf wurden sie 4 Stunden im Trockenschrank bei 120° C und dann 12 Stunden im Exsikkator aufbewahrt. Nach der folgenden Wägung mit Inhalt wurden die Kolben gewaschen, wiederum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann das Leergewicht bestimmt.

Isolierung der Phosphatidfraktion

Die Auftrennung der Gesamtlipoide in die Neutralfette und die Phosphatide erfolgte in der von EBERHAGEN und BETZING (35) angegebenen Apparatur. Prinzip des dabei angewendeten Trennverfahrens ist folgender, von BOLDINGH (36) erstmals für diese Zwecke nutzbar gemachter Effekt: Polare Verbindungen, wie die Phosphatide, haben die Eigenschaft, in unpolaren Lösungsmitteln zu Polymeren zu aggregieren, d.h., es kommt zu größeren Teilchenvolumina. Dies macht es möglich, die Phosphatide durch Dialyse von den niedermolekularen, unpolaren Anteilen des Lipoidgemisches abzutrennen, die diese Eigenschaft nicht besitzen. Als Lösungsmittel wurde Petroläther verwendet. Als Dialysiermembranen wurden Gummifingerlinge benutzt, wie sie in der klinischen Diagnostik bei der rektalen Untersuchung Anwendung finden. Um die petroläther-löslichen Bestandteile zuvor aus den Fingerlingen zu entfernen, wurden diese einmal 1 Stunde in Äther, 3 mal 1 Stunde in Petroläther und nochmals über Nacht in Petroläther ge-

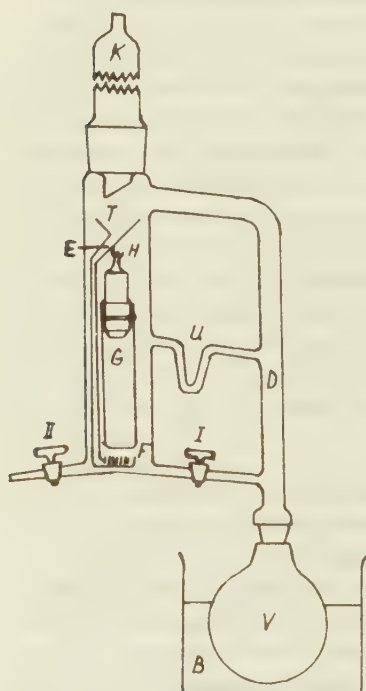


Abb. 2: Vorrichtung für die Dialyse der Lipoide nach EBERHAGEN und BETZING (1962), 18

waschen. Mit einer Pipette wurde das in Petroläther gelöste Lipoidgemisch in den Gummifingerling G gegeben, dieser in einer Einspannvorrichtung am Haken H des Einsatzes E angebracht und in das Rohr des Dialysegerätes eingeführt. Vorher war der Vorratskolben V bis zur Hälfte (ca. 250 ccm) mit Petroläther gefüllt worden. Mit Hilfe eines auf 75° - 80° aufgeheizten Glycerinbades wurde dann der Inhalt von V zum Sieden gebracht. Der Lösungsmitteldampf geht durch die Dampfzuleitung D zum Kühler K und wird dort kondensiert. Das Kondensat tropft in den Trichter T des Einsatzes, gelangt auf dessen Boden und tritt gleichmäßig verteilt durch die Glasfritte F in das Dialysiergefäß aus. Durch den Überlauf U kommt es zum Rückfluß in den Vorratskolben. Somit ist eine ständige Erneuerung und eine maximale Bewegung der Dialysierflüssigkeit

garantiert. Der Austauschvorgang lief über Nacht, d. h., 20 bis max. 24 Stunden.

Nach Beendigung der Dialyse wurde der Einsatz E aus dem Gefäß genommen, der Gummifingerling über einen Rundkolben gehalten und an seiner tiefsten Stelle mit einem Draht durchbohrt, so daß die nicht-dialysablen Phosphatide ausfließen konnten. Die Petrolätherlösung wurde im Rundkolben eingedampft, mit Chloroform in ein Schliffröhrchen überführt, wieder eingedampft und nach 24-stündiger Trocknung im Exsikkator das Gewicht der Phosphatide bestimmt. Nach der Wägung wurden sie in 5 ccm Chloroform gelöst aufbewahrt. Der Inhalt des Dialysegefäßes wurde über Hahn I in den Rundkolben entleert und dann das Lösungsmittel vom Dialysat abdestilliert. Zur Bestimmung des Neutralfettgewichtes wurde wie bei den Phosphatiden verfahren.

Zur dünnsschichtchromatographischen Reinheitsuntersuchung der Phosphatidfraktion wurde nach den Angaben von ZÖLLNER und WOLFRAM (1962) vorgegangen. Fettfreie, gereinigte Glasplatten von der Größe 16 x 16 cm wurden mit einem Streichgerät der Firma Desaga, Heidelberg, 0,25 mm dick mit Kieselgel nach STAHL beschichtet. Die Platten wurden zuerst an der Luft und anschließend im Trockenschrank bei 150° C getrocknet. Entlang einer Plattenkante, und zwar so, daß die vorgesehene Laufrichtung senkrecht zur Streichrichtung der Kieselgelschicht verlief, wurden nun die zu untersuchenden Substanzen als 1 cm langer Strich mit einer Mikropipette aufgetragen. Anschließend wurde die Platte in eine Glaskammer, die ein Gemisch aus Petroläther : Äthylmethylketon : Eisessig = 95 : 4 : 1 enthielt, so gestellt, daß die Grundkante der Platte ca. 1 cm tief in das Lösungsmittelgemisch eintauchte. Um eine vollständige Sättigung der Atmosphäre zu erreichen, war die Glaskammer mit Filterpapier ausgeschlagen und luftdicht verschlossen. War das Fließmittel bis an den oberen Rand der Platte aufgestiegen, so wurde sie der Kammer entnommen und nach Lufttrocknung mit 50 %iger H₂SO₄ besprüht. Die organischen Anteile wurden daraufhin im Trockenschrank verkohlt und aus der Steighöhe der verschiedenen Anteile in den Substanzgemischen konnte die vorausgegangene Trennung Phosphatide - Neutralfette überprüft werden. Hierbei blieben die Phosphatide am Auftragswert liegen; im senkrechten Verlauf über ihnen durfte keine andere Fraktion erkennbar sein. Bei der Fraktion der Neutralfette waren auf entsprechender Steighöhe die Anteile an Cholesterin, freien Fettsäuren, Triglyceriden und Cholesterinester nachzuweisen. Auch wurden die für dieses Lösungsmittelsystem bekannten R_F-Werte zur Kontrolle herangezogen.

Darstellung der Phosphatidfettsäuren

Die Fettsäuren wurden aus den Phosphatiden durch Umesterung gewonnen. Dazu löste man die in einem 100 ml Rundkolben eingedampften Proben in wenigstens der 20-fachen Menge 5 %iger methanolischer Schwefelsäure (20 ml), die durch vorsichtiges Eintropfen von 1 ml konzentrierter H_2SO_4 p. a. in 30 ml absolutem Methanol p. a. gewonnen wurde, und kochte das Gemisch 90 Minuten lang bei einer Badtemperatur von 85°C unter Rückfluß. Nach dem Erkalten wurde die Lösung dann zusammen mit 20 bis 30 ml Aqua dest. in einen Scheidetrichter überführt und 4 mal mit 10 ccm Petroläther : Äther (1 : 1) ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde verworfen. Die vereinigten Petroläther-Äther-Phasen, in denen sich die Methyl ester der Phosphatidfettsäuren befanden, wurden durch mehrmaliges Durchschütteln mit Aqua dest. säurefrei gewaschen. Noch vorhandene Spuren von H_2O wurden durch Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat entzogen. Nach dieser Trocknung wurde die Lösung in einen Rundkolben abfiltriert, eingedampft und der Rückstand mit Chloroform in ein Schliffröhrchen überführt. Nach der üblichen Vorbereitung wurde gewogen und die nun gewichtsmäßig bestimmten Fettsäuremethylester zu weiterer Bestimmung in der 10-fachen Gewichtsmenge Chloroform gelöst.

Gaschromatographische Untersuchung der Phosphatidfettsäuren

Die gaschromatographische Auftrennung der Fettsäure-Methylestergemische wurde mit einem Gerät der Firma Packard Instrument Company, La Grange, USA, durchgeführt, das mit einem sog. Argondetektor ausgestattet war. Die zwei gläsernen, zu einer Spirale gebogenen Trennsäulen hatten eine Länge von 180 cm und einen inneren Durchmesser von 0,5 cm. Sie enthielten ein Kieselgelpräparat (Chromosorb) mit einer Korngröße von 60 - 80 mesh als inertes Trägermaterial, das eine 20 %ige Imprägnierung von Äthylenglykol-Bernsteinsäurepolyester als stationäre Phase besaß. Als Trägergas wurde Argon verwandt. Es wurden folgende Betriebsbedingungen eingehalten:

Strömungsgeschwindigkeit des Gases	100 ml / min
Druckabfall längs der Säule	1,6 kg / cm^2
Säulentemperatur	196°C
Probeverdampfer	285°C
Detektortemperatur	215°C
Hochspannung	500 V
Verstärkung	$3 \times 10^{-7} \text{ A}$

Die Fettsäuremethylester wurden in Chloroform gelöst mit einer Mikroinjektionsspritze (Firma Hamilton, Witthier, Cal., USA) in die Trennsäule eingeführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß von jeder Substanz ein Chromatogramm geschrieben wurde, auf dem alle Ausschläge in ganzer Höhe aufgezeichnet waren; zusätzlich wurde ein zweites geschrieben, auf dem die kleinsten Substanzanteile noch einen gut auswertbaren Ausschlag ergaben.

Neben der gaschromatographischen Untersuchung der nativen Methylestergemische wurden die Phosphatidfettsäuren auch in hydrierter Form in dieser Weise analysiert. Die Hydrierung der C=C-Doppelbindung geschieht üblicherweise durch Schütteln der in einem geeigneten Lösungsmittel gelösten Lipide in Wasserstoffatmosphäre mit Katalysatoren.

Hierzu wurden 10 mg Fettsäureester aus ihrer Chloroformlösung in einem Hydriergefäß A eingedampft und dann in 5 ccm Methanol p. a. gelöst.

Nach Einlegen eines Rührmagneten H und Zugabe einer kleinen Spatelspitze Palladiumkohle wurde das Hydrierglas mit dem eingefetteten Schliff N des Gerätes gasdicht verbunden. Über den Dreiwegehahn D wurde die Apparatur nach Verdrängung der Luft mit Wasserstoff gefüllt. Das geschlossene System stand während des Versuches unter Normaldruck. Die Wasserbadtemperatur wurde zwischen 35° und 45° C gehalten. Nach einstündigem Rühren wurde das Hydrierglas abgenommen, der NS-Schliff des Glases mit einem äthergetränkten Wattebausch entfettet und der Inhalt über ein vorher mit Diäthyläther p. a. angefeuchtetes Faltenfilter in ein Schliffröhrchen abfiltriert. Hydrierglas, Rühr-

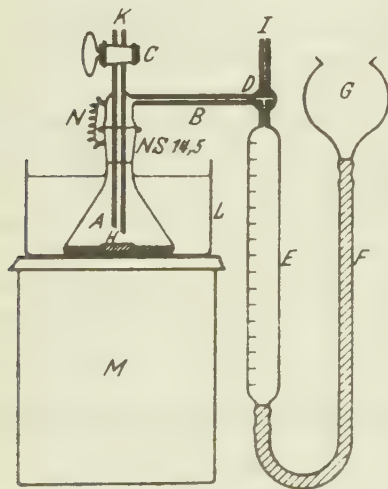


Abb. 3: Hydrierapparat (aus ZÖLLNER/EBERHAGEN; Untersuchungen der Lipide im Blut).

fisch und Filter wurden mehrmals mit Diäthyläther gründlich nachgespült. Die Lösungen mit den hydrierten Fettsäureestern wurden eingengt, in wenig Chloroform gelöst und dann gaschromatographisch aufgetrennt.

Zu dieser Trennung wurde ein Gerät der Firma Bodenseewerk, Perkin & Elmer, Modell 116 E, verwendet. Die Auswertung der Gaschromatogramme geschah in folgender Weise: Zur Identifizierung der einzelnen Banden wurden ihre Retentionszeiten mit Chromatogrammen bekannter Methylestergemische verglichen, die unter gleichen Bedingungen gewonnen wurden. Häufig wurde die Zuordnung über die "Kohlenstoffzahl" nach WOODFORD und VAN GENT (37) durchgeführt: Das relative Retentionsvolumen $R_{V_{rel}}$ wird durch den Quotienten aus R_V der fraglichen Komponente und R_V einer Bezugssubstanz (z. B. Palmitin- oder Stearinsäuremethylester) ausgedrückt. Die Kohlenstoffanzahl ergibt sich dadurch, daß auf Millimeterpapier der Logarithmus R_V von den leicht in den Chromatogrammen zu identifizierenden gesättigten, unverzweigten Fettsäuremethylestern gegen die Zahl der C-Atome in diesen Leitkomponenten aufgetragen wird. Als Verbindungslinie dieser Punkte erhält man ab einer gewissen Kettenlänge eine Gerade (JAMES und MARTIN, 1952). Dem $\log. R_V$ der übrigen Banden entsprechen nur bestimmte Punkte auf dieser Geraden und damit auch bestimmte Werte auf der "Kohlenstoffzahl"-Ordinate.

Die Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung der Fettsäuren erfolgte bei der Auswertung der Chromatogramme nach dem Dreiecksverfahren. Man legte dazu an jede einzelne Substanzbande die beiden Wendepunktstangenten und die zugehörige Grundlinie; es entstand ein gleichschenkeliges Dreieck, dessen Fläche sich leicht errechnen ließ. Ebenso wurde bei den Chromatogrammen der hydrierten Substanzen verfahren, hier ihre Flächeneinheiten addiert und gleich 100 % gesetzt. Daraus ließen sich die quantitativen Verhältnisse unter Berücksichtigung der Kettenlänge der Komponenten berechnen. Die weitere Differenzierung nach dem Grad der Ungesättigtheit erfolgt aus den Chromatogrammen der nicht-hydrierten Substanzen.

Spektroskopische Untersuchung der mehrfach ungesättigten Phosphatidfettsäuren

Bei einer anderen Arbeitsweise zur Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung bedient man sich der Ausbildung charakteristischer Absorptionsbanden im ultravioletten Wellenbereich. Mit dieser Methode werden allerdings nur die Fettsäuren mit mehreren Doppelbindungen - die sog. Polyen-Fettsäuren - erfaßt, deren isoliert vorliegende Doppelbindungen zuvor unter Anwendung erhöhter Temperaturen im alkalischen Milieu zu konjugierten umgelagert werden müssen. Zur Isomisierung wurden 2,1 mg der Phosphatidfettsäuremethylester ($\approx$ 2,0 mg Fettsäuren) einer jeden Versuchssubstanz verwendet. Mit 2 x 2 ccm Äthanol wurde die

Fettsäurelösung zunächst eingedampft, der Rückstand in 0,3 ccm Äthanol gelöst und in ein Isomerisierröhrchen A_1 übergeführt. Die Nachspülmenge beim Überführen wurde bei allen Proben konstant gehalten (0,2 ccm Äthanol). Nach Zugabe von 0,5 ccm einer 21 %igen KOH-Glykol-Lösung (24,1 g KOH p. a. in 100 ml Äthylenglykol puriss. unter Erwärmen gelöst) wurden die Röhrchen am Gestänge E eines Vibrators (Sartorius-Werke, Göttingen) befestigt, mit einer N_2 -Einleitungsvorrichtung B und C verschlossen und dann für 20 Minuten auf genau 180 °C (Glycerinbad) erhitzt. Die Strömungsgeschwindigkeit des Stickstoffes wurde mit einem Blasenähler kontrolliert, um ein Abblasen des Lösungsmittels zu vermeiden. Die Röhrchen mit dem denn völlig entfärbten oder noch blaßgelb gefärbten Inhalt wurden nach dem Bad entnommen, mit H_2O abgekühlt, ihr Inhalt in Methanol gelöst und in Meßkolben auf 50 ccm aufgefüllt. Bei jeder Serie wurde eine Blindprobe mit 0,5 ccm Äthanol und 0,5 ccm KOH-Glykol mitgeführt. Die Vermessung der Spektren erfolgte mit einem Spektralphotometer, Modell DB

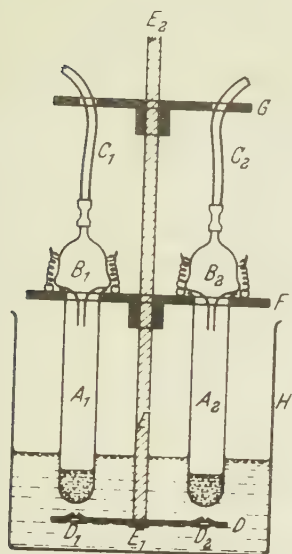


Abb. 4: Isomerisierungsapparatur
(aus ZÖLLNER/EBERHAGEN;
Unters. der Lipotide im Blut).

der Firma Beckman Instruments, München, in einem Bereich zwischen 220 - 400 $m\mu$. Als Eichsubstanzen wurden benützt:

Linolensäure	(Firma Roth)
Linolsäure	(Hoffmann - La Roche)
Arachidonsäure	aus labor-eigenen Beständen
Eikosapentaensäure	
Dokosahexaensäure	

Die Bestimmung ihrer spezifischen Extinktionen erfolgte nach Alkali-Isomerisierung in der beschriebenen Weise; für die vorliegende Versuchsreihe ergaben sich dabei folgende Werte:

Tab. II: Spezifische Extinktionen der als Eichsubstanzen verwendeten
alkali-isomerisierten Fettsäuren

Serie A	Wellenlänge m μ	234	268	300	346	374
	Linolsäure	910	-	-	-	-
	Linolensäure	610	780	-	-	-
	Arachidonsäure	490	485	670	-	-
	Eikosapentaensäure	480	400	470	540	-
	Docosahexaensäure	420	385	350	360	220
Serie B *	Wellenlänge m μ	234	268	300	346	374
	Linolsäure	1000	-	-	-	-
	Linolensäure	485	835	-	-	-
	Arachidonsäure	525	540	755	-	-
	Eikosapentaensäure	555	560	635	750	-
	Docosahexaensäure	455	405	380	375	240

* Für Serie B war eine KOH-Glykollösung neu bereitet worden. Die quantitative Auswertung der Spektrogramme wurde auf Grund folgender Beziehungen vorgenommen (38). Die gemessene Gesamtextinktion E bei der Wellenlänge λ setzt sich additiv aus den Einzelextinktionen der Substanzen zusammen:

$$E_{\lambda} = E_{\lambda_1} + E_{\lambda_2} + \dots + E_{\lambda_n} = \sum_1^n E_{\lambda_n}; \quad (1 \text{ a})$$

$$= e_{\lambda_1} \cdot c_1 + e_{\lambda_2} \cdot c_2 + \dots + e_{\lambda_n} \cdot c_n = \sum_1^n e_{\lambda_n} \cdot c_n; \quad (1 \text{ b})$$

Es bedeuten: e_{λ} = die spezifischen Extinktionskoeffizienten der Substanzen 1 bis n bei der Wellenlänge λ ;

c = die entsprechenden Konzentrationen.

Die Konzentrationen im Fettsäuregemisch lassen sich nach (1 b) folgendermaßen errechnen:

für Serie A:

$$E_{234} = 910 \cdot c_2 + 610 \cdot c_3 + 490 \cdot c_4 + 480 \cdot c_5 + 420 \cdot c_6;$$

$$E_{268} = 780 \cdot c_3 + 485 \cdot c_4 + 400 \cdot c_5 + 385 \cdot c_6;$$

$$E_{300} = 670 \cdot c_4 + 470 \cdot c_5 + 350 \cdot c_6;$$

$$E_{346} = 540 \cdot c_5 + 360 \cdot c_6;$$

$$E_{374} = 220 \cdot c_6;$$

$$\%C_6 = 4,545 \text{ E } 374;$$

$$\%C_5 = 1,851 \text{ E } 346 \text{ }^{-3,028} \text{ E } 374;$$

$$\%C_4 = 1,492 \text{ E } 300 \text{ }^{-1,296} \text{ E } 346 \text{ }^{-0,249} \text{ E } 374;$$

$$\%C_3 = 1,282 \text{ E } 268 \text{ }^{-0,926} \text{ E } 300 \text{ }^{-0,143} \text{ E } 346 \text{ }^{-0,535} \text{ E } 374;$$

$$\%C_2 = 1,098 \text{ E } 234 \text{ }^{-0,858} \text{ E } 268 \text{ }^{-0,183} \text{ E } 300 \text{ }^{-0,182} \text{ E } 346 \text{ }^{-0,0076} \text{ E } 374;$$

für Serie B:

$$E_{234} = 100 \cdot c_2 + 485 \cdot c_3 + 525 \cdot c_4 + 555 \cdot c_5 + 455 \cdot c_6;$$

$$E_{268} = 835 \cdot c_3 + 540 \cdot c_4 + 560 \cdot c_5 + 405 \cdot c_6;$$

$$E_{300} = 755 \cdot c_4 + 635 \cdot c_5 + 380 \cdot c_6;$$

$$E_{346} = 750 \cdot c_5 + 375 \cdot c_6;$$

$$E_{374} = 240 \cdot c_6;$$

$$\%C_6 = 4,166 \text{ E } 374;$$

$$\%C_5 = 1,333 \text{ E } 376 \text{ }^{-2,082} \text{ E } 374;$$

$$\%C_4 = 1,324 \text{ E } 300 \text{ }^{-1,120} \text{ E } 346 \text{ }^{-0,345} \text{ E } 374;$$

$$\%C_3 = 1,197 \text{ E } 268 \text{ }^{-0,854} \text{ E } 300 \text{ }^{-0,169} \text{ E } 346 \text{ }^{-0,402} \text{ E } 374;$$

$$\%C_2 = 1,0 \text{ E } 234 \text{ }^{-0,580} \text{ E } 268 \text{ }^{-0,281} \text{ E } 300 \text{ }^{-0,070} \text{ E } 346 \text{ }^{-0,365} \text{ E } 374;$$

Als Beispiel ist in der Abb. 5 das Spektrum eines Fettsäuremethylester-
gemisches des 6-Stunden-Wertes im Wellenbereich von 220 - 400 mμ
wiedergegeben.

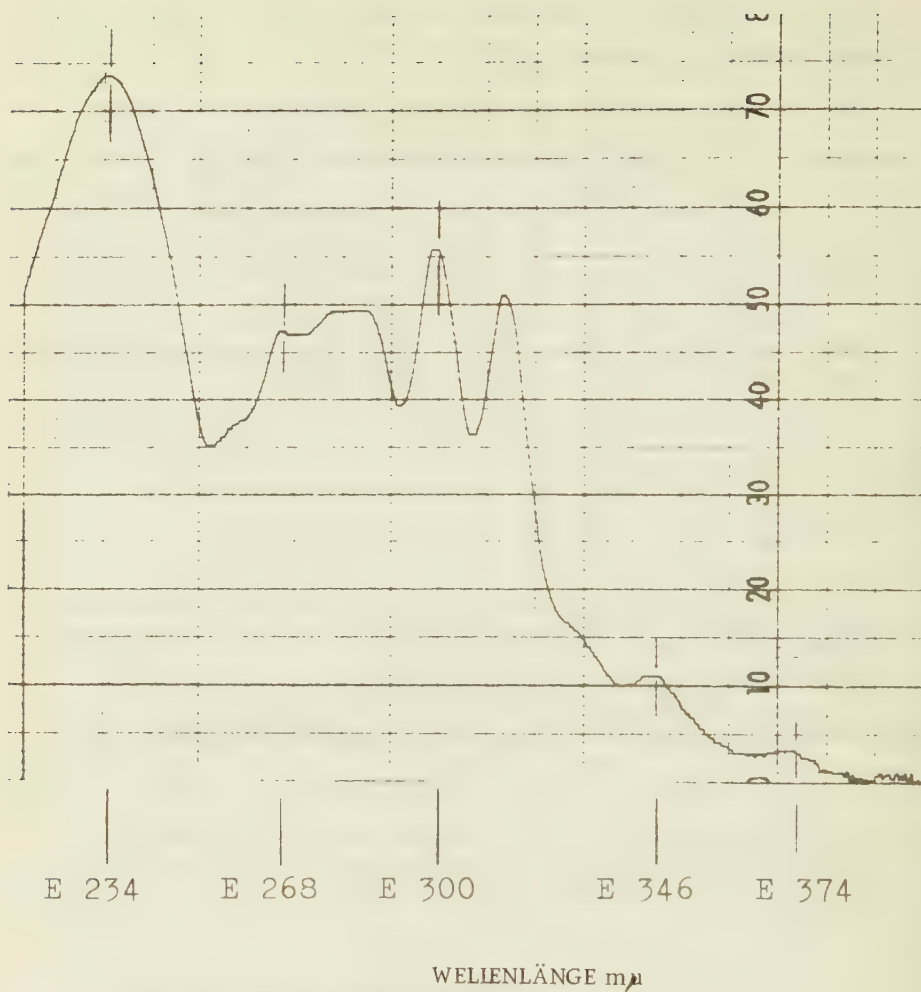


Abb. 5: Spektrogramm eines Fettsäuremethylestergemisches (6-Stunden-Wert) nach Alkaliisomerisierung.

In der Tabelle III ist die erzielte Präzision der Methode, die durch eine Zehnfach-Bestimmung ermittelt wurde, aufgeführt.

Tabelle III: Streuungskontrolle zur UV-Spektroskopie

Polyenfettsäuren	Mittelwert	Schwankungsbereich + Abweichung	Standard- abweichung	Standardabweichung des Mittelwertes	
Diensäuren	7,61	6,92 - 10,17 (-0,69 + 2,66)	$\pm 1,10$	$\pm 0,34$	$\hat{=} 4,46\%$
Triensäuren	1,52	1,22 - 1,97 (-0,30 + 0,25)	$\pm 0,20$	$\pm 0,063$	$\hat{=} 4,14\%$
Tetraensäure	15,0	14,05 - 15,55 (-0,95 + 0,55)	$\pm 0,41$	$\pm 0,12$	$\hat{=} 0,80\%$
Pentaensäuren	1,91	1,72 - 2,10 (-0,19 + 0,19)	$\pm 0,13$	$\pm 0,041$	$\hat{=} 2,14\%$
Hexaensäuren	3,17	3,10 - 3,32 (0,07 - 0,15)	$\pm 0,10$	$\pm 0,031$	$\hat{=} 0,97\%$

Reagenzien

Alle verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien waren - soweit nicht anders vermerkt - p. a. Qualitäten der Firma E. MERCK, Darmstadt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die in Tabelle IV angeführten Ergebnisse stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen des Mittelwertes je einer untersuchten Gruppe dar, d. h., sie setzen sich bei der Kontrollgruppe und beim 0,5-, 3-, 12-, 24- und 48-Stundenwert aus je 5, beim 6-Stundenwert aus je 4 und beim 60-Stundenwert aus je 10 Einzelwerten zusammen. Alle erfolgten Messungen sind in Bezugsgrößen ausgedrückt, da ihre absoluten Werte im individuellen Tierversuch nichts aussagen würden. Alle Einzelwerte dieser Versuchsreihe sind als Anhang beigefügt.

Tabelle IV: Die Zusammensetzung der Rattenlebern: Die Angaben geben den Mittelwert mit seiner Standardabweichung wieder; bei den Körpergewichten ist neben dem Durchschnittswert der Schwankungsbereich aufgeführt.

Zeit nach Bestrahlungs- ende	Körper- gewicht g	Organfrisch- gewicht in % des Körper- gewichts	Organtrocken- gewicht* in % des Frisch- gewichts	Gesamtlipide in % des Trocken- gewichts	Gesamtlipide in % des Frisch- gewichts	Neutralfette in % des Trocken- gewichts	Neutralfette in % des Frisch- gewichts	Phosphatide in % des Trocken- gewichts	Phosphatide in % des Frisch- gewichts
Kontrollgruppe	238 (206–260)	3,43 ± 0,14	30,80 ± 0,20	24,87 ± 1,18	7,91 ± 0,44	14,39 ± 1,48	4,66 ± 0,43	10,13 ± 0,86	3,18 ± 0,21
0,5 Std	229 (210–250)	2,78 ± 0,056	27,63 ± 0,33	19,40 ± 1,22	5,35 ± 0,31	8,39 ± 0,87	2,30 ± 0,22	10,72 ± 0,67	2,96 ± 0,19
3 Std	225 (200–248)	3,24 ± 0,10	25,85 ± 0,62	16,61 ± 2,09	4,87 ± 0,78	8,57 ± 1,01	1,42 ± 0,28	9,67 ± 1,00	2,52 ± 0,30
6 Std	231 (200–250)	3,80 ± 0,108	26,21 ± 0,63	15,66 ± 0,81	4,11 ± 0,28	4,19 ± 0,41	1,10 ± 0,24	9,70 ± 0,27	2,54 ± 0,10
12 Std	223 (195–246)	3,76 ± 0,10	28,34 ± 0,57	16,65 ± 1,00	4,71 ± 0,30	5,48 ± 0,97	1,55 ± 0,28	9,78 ± 0,30	2,78 ± 0,080
24 Std	211 (190–240)	4,30 ± 0,094	27,60 ± 0,69	15,45 ± 1,34	4,27 ± 0,44	4,97 ± 0,68	1,37 ± 0,20	8,27 ± 0,49	2,29 ± 0,17
48 Std	204 (190–235)	4,43 ± 0,071	26,88 ± 0,74	20,89 ± 0,96	5,79 ± 0,38	9,46 ± 1,65	2,75 ± 0,49	9,77 ± 0,78	2,80 ± 0,19
60 Std †	189 (170–205)	4,30 ± 0,035	26,06 ± 0,27	14,09 ± 0,81	3,66 ± 0,13	2,71 ± 0,18	0,70 ± 0,053	10,88 ± 0,44	2,78 ± 0,10

* Als Organtrockengewicht ist die Summe aus Gesamtlipiden (untere Fett-Phase), wasserlöslichen Extraktstoffen (obere Fett-Phase) und extrahiertem Gerberückstand bezeichnet.

Im Stadium der akuten Strahlenkrankheit hatten die Tiere die Nahrungsaufnahme eingestellt. Daraus resultiert eine Verringerung des mittleren Körpergewichtes, die 6 Stunden, noch deutlicher aber 24 Stunden nach der Bestrahlung einsetzte. CONIGLIO (39) weist in diesem Zusammenhang auch auf einen erhöhten fäkalen Fettverlust hin, der zur Gewichtsabnahme beiträgt. Von einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 235 g der unbestrahlten Tiere sank dieser Wert im Laufe der auf die Bestrahlung folgenden Stunden bis zu einem Mittel von 190 g ab. Ver-

antwortlich dafür dürfte neben den genannten Punkten besonders der hohe Wasserverlust des Gesamtorganismus infolge der Darmtraktschädigung sein. Bei der Sektion der an der Strahlenkrankheit zugrunde gegangenen Tiere zeigt sich ein Schwund von Mukosa und Muskularis fast des gesamten Magen-Darmrohres, das praktisch nur noch aus einem dünnen Serosahäutchen bestand.

Die Strahleneinwirkung führte in den ersten 6 Stunden zu einem anfangs sehr ausgeprägten Anstieg des Wassergehaltes in der Leber (ausgedrückt als Differenz zwischen Organfrischgewicht und der Gesamttrockensubstanz). In der 6. bis 48. Stunde nach der Exposition wurde ein Teil des Wassers wieder ausgeschwemmt. Im Terminalstadium fand indessen eine abermalige Wassereinlagerung statt. Ob diese Erscheinungen auf eine Flüssigkeitsverschiebung zwischen den extrazellulären und intrazellulären Räumen oder auf Stauungen im venösen Stromgebiet zurückzuführen sind, kann nicht gesagt werden.

Auf die Zunahme des Lebergewichtes als Bestrahlungsfolge weisen verschiedene Autoren hin (40, 41). Neben dem Wassereinstrom scheint aber auch eine Erhöhung des Leberglykogens dafür verantwortlich zu sein, da nach Arbeiten von ENTENMANN und Mitarb. (42) und NORTH (43) bei einer GKB von 1200 r $\frac{2}{3}$ der Gewichtszunahme der festen Leberbestandteile durch diese Substanz bedingt war.

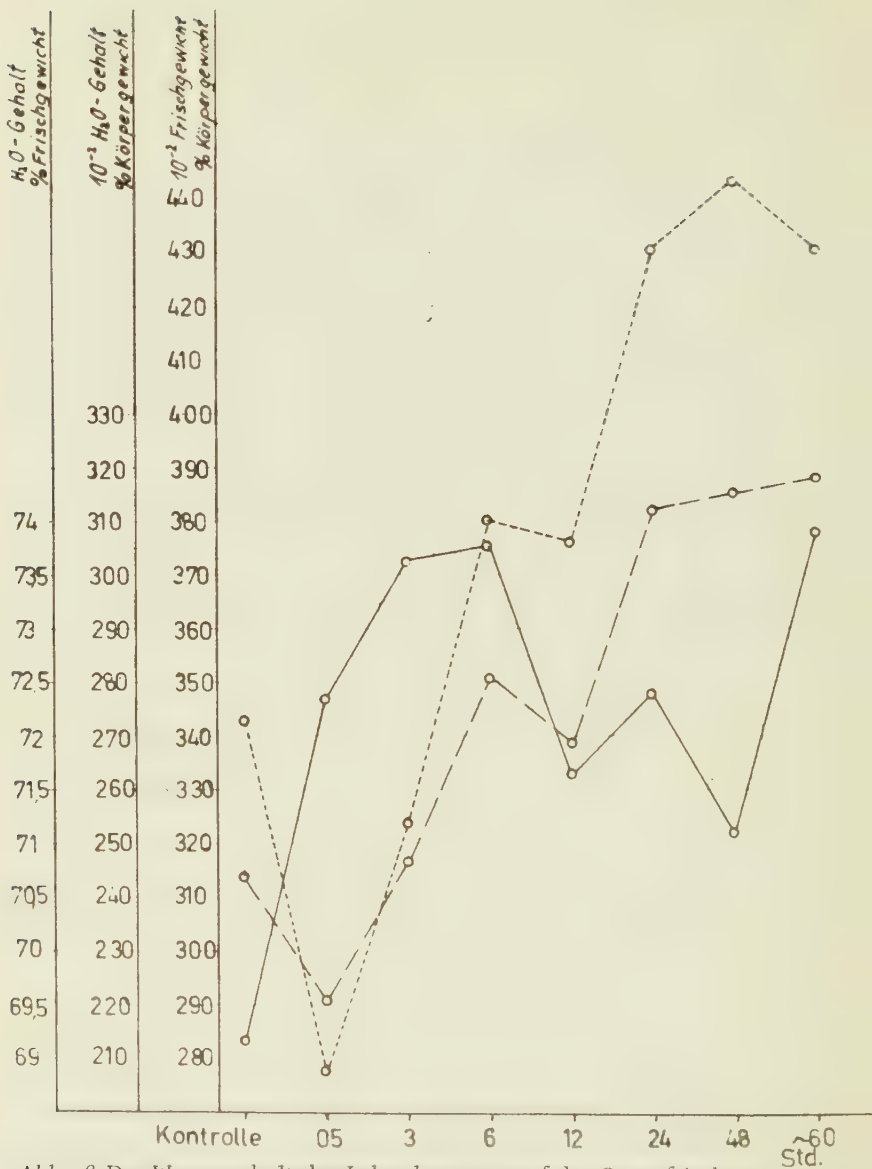


Abb. 6: Der Wassergehalt der Leber bezogen auf das Organfrischgewicht (o—o) und das Körpergewicht (o---o) sowie das Organfrischgewicht in Bezug zum Körpergewicht (o...o)

Der Gesamtlipoidgehalt der Leber (Abb. 7) sank von etwa 24 % vor der Bestrahlung auf 15 % 6 Stunden nach der Strahlenexposition ab. Diese Unterschiede sind signifikant. Anschließend stieg er bis zum 48-Stundenwert auf immerhin 20 % wieder an, fiel dann aber bei den ad exitum gekommenen Tieren auf etwa 14 % wieder ab. Diese Zahlen sind auf das Gesamttrockengewicht bezogen; bei Bezug auf das Frischgewicht liegen die Verhältnisse ähnlich. Der lipoidfreie Geweberückstand ändert sich während der Versuchsdauer nicht wesentlich. Dies gilt als Hinweis darauf, daß kein deutlicher Parenchymschwund stattgefunden hatte.

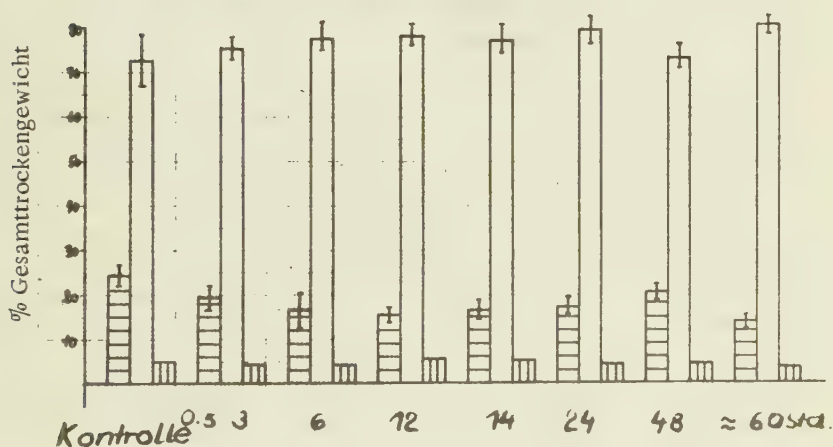


Abb. 7 a: Der Gehalt der Leber an Gesamtlipoiden (querschraffiert), wasserlöslichen Extraktstoffen (längsschraffiert) und extrahiertem Geweberückstand (weiß) in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende und in Bezug auf das Gesamttrockengewicht. Die Bereiche der einfachen Standardabweichungen sind dabei jeweils am Säulenkopf angegeben.

In den folgenden Abbildungen sind die einzelnen Anteile in Bezug auf das Frischgewicht (Abb. 7 b) und auf das Körpergewicht (Abb. 7 c) berechnet. Die Kennzeichnung der Säulen und die Angabe der Standardabweichung entspricht Abb. 7 a.

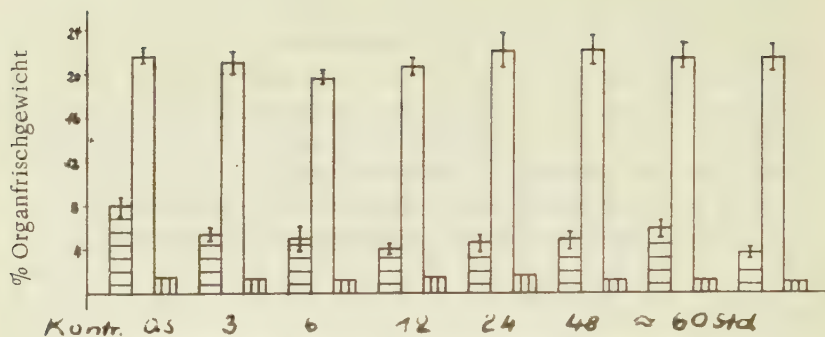


Abb. 7 b: Der Gehalt der Leber an Gesamtlipiden, wasserlöslichen Extraktstoffen und extrahiertem Geweberückstand in Bezug auf das Organfrischgewicht.

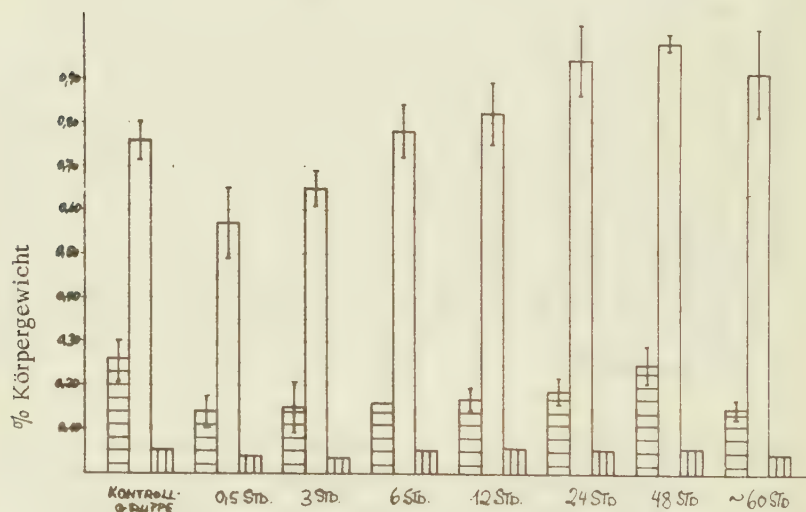


Abb. 7 c: Der Gehalt der Leber an Gesamtlipiden, wasserlöslichen Extraktstoffen in Bezug auf das Körpergewicht.

In der Zusammensetzung der Leberlipide (Abb. 8) kam es bereits 30 Minuten nach dem Ende der Bestrahlung zu einer drastischen Verringerung des Neutralfettgehaltes, die wenigstens 6 Stunden anhielt. Dabei verminderten sich die Substanzen von 14,4 % der Gesamttrockensubstanz in den Lebern der Kontrollgruppe auf 4,2 % bei den 6-Stunden-Tieren. Danach kam es langsam zur Wiedereinlagerung von Fett in

die Leberzellen, so daß 48 Stunden nach dem Strahlungsinsult immerhin über 9,4 % der Gesamttrockensubstanz wieder aus diesen Verbindungen bestanden. In der Terminalphase der akuten Strahlenkrankheit zeigte sich eine erneute Neutralfettverarmung, die dieses Mal einen Wert von einem Fünftel des Ausgangswertes erreichte.

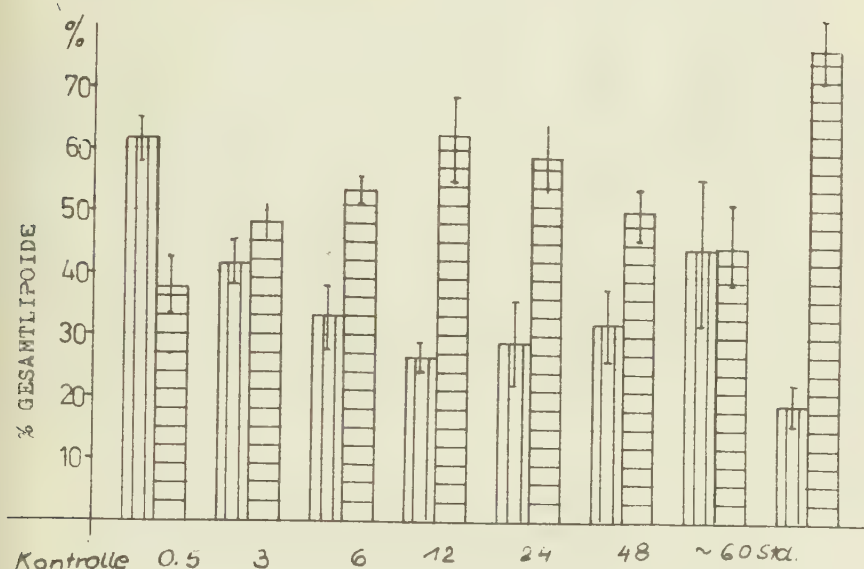


Abb. 8 a: Der Gehalt der Leber an Neutralfetten (längsgestreift) und Phosphatiden (quergestreift) in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungsende. Als Bezugsgröße dient der Gesamtlipoidgehalt. Der Bereich der einfachen Standardabweichung ist am Säulenkopf angegeben.

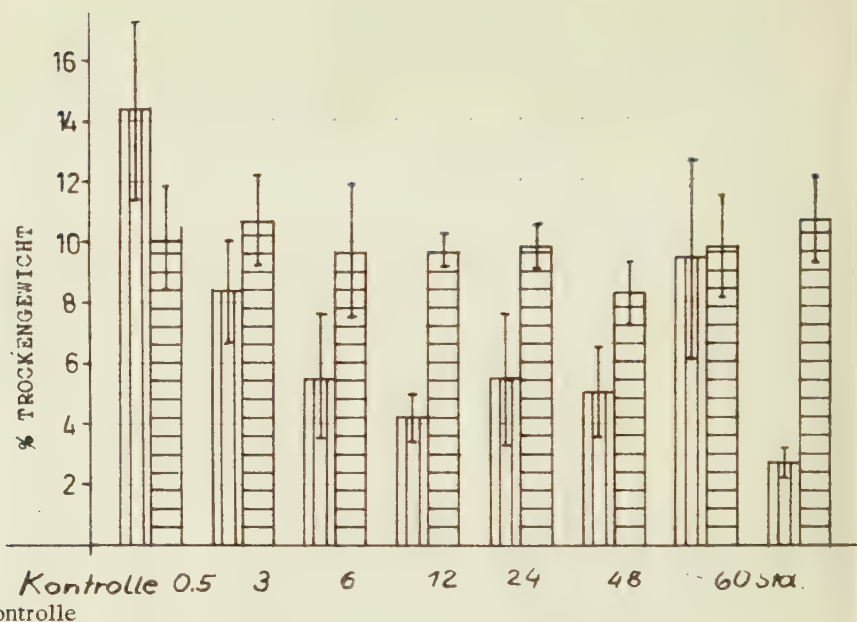


Abb. 8 b: Der Gehalt der Leber an Neutralfetten und Phosphatiden in Bezug auf das Trockengewicht. Kennzeichnung der Säulen und Angabe der Standardabweichung wie in Abb. 8 a.

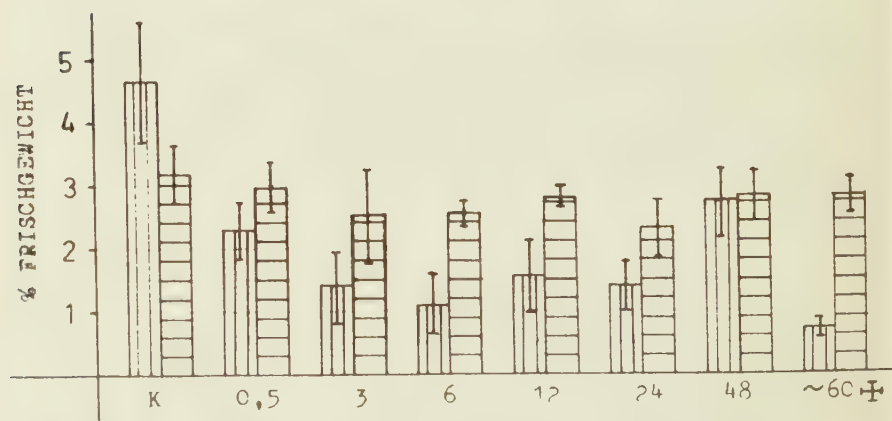


Abb. 8 c: Der Gehalt der Leber an Neutralfetten und Phosphatiden in Bezug auf das Organfrischgewicht. Kennzeichnung der Säulen und Angabe der Standardabweichung wie in Abb. 8 a.

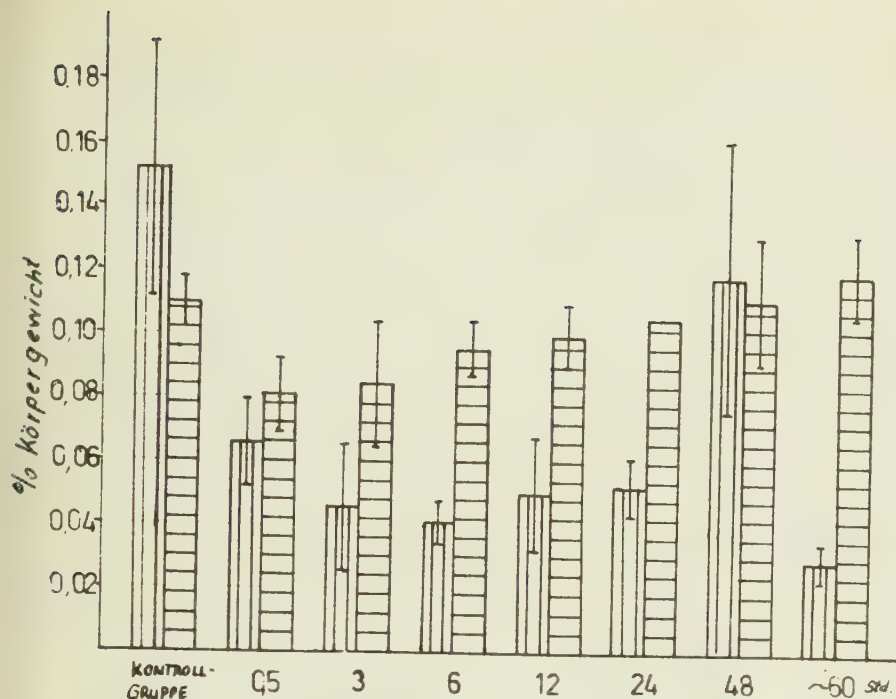


Abb. 8 d: Der Gehalt der Leber an Neutralfetten und Phosphatiden in Bezug auf das Körpergewicht. Kennzeichnung der Säulen und Angabe der Standardabweichung wie in Abb. 8 a

Demgegenüber wurde der Phosphatidgehalt der Lebertrockensubstanz - in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren (44) - nicht erkennbar durch die schwere akute Strahlenkrankheit beeinflusst. Dies ergibt sich besonders deutlich aus dem Quotienten Gesamtphosphatide / extrahierter Geweberückstand, der sich zwischen 0,11 und 0,14 bewegte und damit praktisch konstant blieb (Abb. 9). Der in den ersten 3 Stunden verzeichnete Abfall der Phosphatide in Bezug auf das Leberfrischgewicht ist durch den Wassereinstrom in das Organ beeinträchtigt (Vergleiche mit Abb. 6).

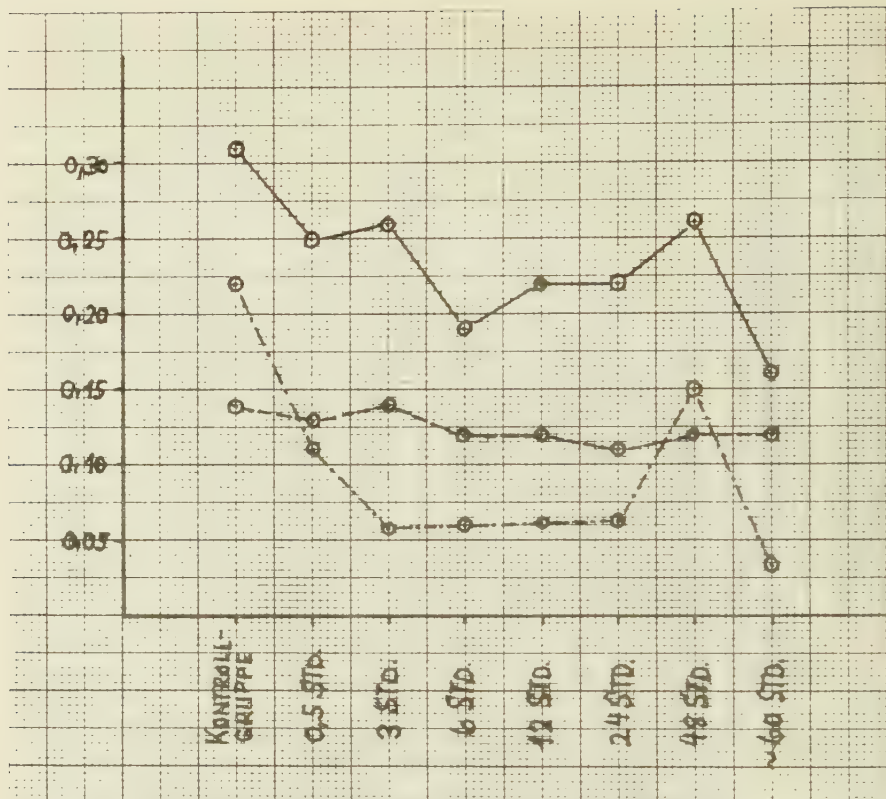


Abb. 9: Die Änderung in Gesamtlipoid- (o — o), Phosphatid- (o --- o) und Neutralfettgehalt (o ··· o) als Quotient mit dem extrahierten Geweberückstand als Bezugsgröße für die nichtlipide Trockensubstanz.

Ob es allerdings trotz des sich wenig ändernden Phosphatidgehaltes nicht doch zu einem Wechsel in der Zusammensetzung der Phosphatide gekommen war, kann nicht gesagt werden. Es gibt jedenfalls einen Bericht einer russischen Autorin, nach dem es im Anschluß an eine GKB mit einer ähnlich hohen Strahlendosis zu einer Erhöhung bzw. Verminderung einiger derartiger Verbindungen um 50 % gekommen sein soll (39).

Bei der gaschromatographischen Untersuchung der Phosphatidfettsäuren fanden sich ebenfalls keine sehr ausgeprägten Veränderungen. Zunächst muß erwähnt werden, daß eine große Anzahl von Fettsäuren nur in sehr geringen Mengen vorlag, so daß an ihnen keine statistisch signifikanten

Veränderungen festgestellt werden konnten. Neben den in der Tabelle V zusammengefaßten Ergebnissen waren im Gemisch der Leberphosphatid-fettsäuren noch folgende Komponenten enthalten:

Pentadecansäure	(C _{15:0}) in Spuren
Eikosadiensäure	(C _{20:2}) in Spuren
Myristinsäure	(C _{14:0}) in Mengen bis max. 0,5 %
Margarinsäure	(C _{17:0}) "
Linolensäure	(C _{18:3}) "
Eikosensäure	(C _{20:1}) "
Dokosensäure	(C _{22:1}) in Mengen bis max. 1 %
Dokosatetraensäure	(C _{22:4}) "
Dokosapentaensäure	(C _{22:5}) "
Der Gehalt an Eikosatriensäure	(C _{20:3}) erreichte max. 4 %.

Tab. V: Gaschromatographisch ermittelte prozentuale Zusammensetzung der in größeren Mengen vorkommenden Phosphatidfettsäuren. Die Angaben geben die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wieder. Im einzelnen steht das Symbol

C_{16:0} für Palmitinsäure, C_{16:1} für Palmitoleinsäure,
C_{18:0} für Stearinsäure, C_{18:1} für Ölsäure,
C_{18:2} für Linolsäure, C_{20:4} für Arachidonsäure und
C_{22:6} für Dokosahexaensäure.

Zeit nach Bestrahlungs- ende	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:4}	C _{22:6}
Kontrollgruppe	19,4 ± 1,2	2,3 ± 0,2	22,9 ± 1,6	10,6 ± 0,7	9,7 ± 0,3	25,4 ± 1,6	3,8 ± 0,3
0,5 Std.	20,3 ± 0,5	2,3 ± 0,2	23,1 ± 0,8	8,9 ± 0,4	9,4 ± 0,2	25,5 ± 1,0	6,0 ± 0,6
3 Std.	18,6 ± 1,2	2,1 ± 0,2	24,8 ± 1,6	8,0 ± 0,8	10,6 ± 0,5	24,6 ± 1,2	4,9 ± 0,4
6 Std.	19,9 ± 0,9	2,4 ± 0,1	24,0 ± 0,5	10,3 ± 0,3	9,5 ± 0,7	22,5 ± 1,1	3,6 ± 0,1
12 Std.	19,6 ± 1,3	3,4 ± 0,5	22,1 ± 0,2	10,8 ± 0,3	11,0 ± 0,6	22,0 ± 3,1	5,8 ± 0,4
24 Std.	20,5 ± 0,3	2,0 ± 0,2	24,0 ± 1,3	8,5 ± 0,6	10,6 ± 0,4	23,0 ± 0,2	5,0 ± 0,7
48 Std.	18,6 ± 0,3	1,4 ± 0,1	26,8 ± 1,8	7,6 ± 0,4	9,1 ± 0,4	25,8 ± 1,0	4,8 ± 0,4
60 Std. †	19,5 ± 1,2	0,9 ± 0,1	28,9 ± 1,2	7,0 ± 0,3	11,4 ± 1,0	23,0 ± 1,8	5,4 ± 0,8

Bei der Stearinsäure, die im Gegensatz zu den Neutralfetten in den Phosphatiden in großen Mengen vorhanden ist, wurde in den ersten 3 Stunden ein leichter Anstieg festgestellt, dem sich während der folgenden 9 Stunden ein Rückgang dieses Gemischanteiles auf den Aus-

gangswert anschloß.

In der letzten Phase der Strahlenkrankheit erfolgte eine bis zum Tod der Tiere anhaltende Stearinsäureanreicherung. Gegensinnig dazu und untereinander gleichphasig verhalten sich die Palmitoleinsäure und die Ölsäure. Von einem Maximum bei 12 Stunden fallen beide bis zum letzten Stundenwert ab. Unbeeinflusst von der Strahlenwirkung zeigt sich während der ganzen Beobachtungsdauer die Palmitinsäure. Das Verhalten der Arachidonsäure ist durch einen 12 Stunden lang anhaltenden Abfall gekennzeichnet. Bis zum 48-Stundenwert folgte eine Wiedereinlagerung dieser Fettsäure in die Phosphatide, so daß die Ausgangslage wieder erreicht wurde. In der ad exitum gekommenen Tiergruppe war ihr Gehalt dann wieder verringert. Gegensinnig zur Arachidonsäure zeigte sich erwartungsgemäß deren Stoffwechselvorläufer, die Linolsäure.

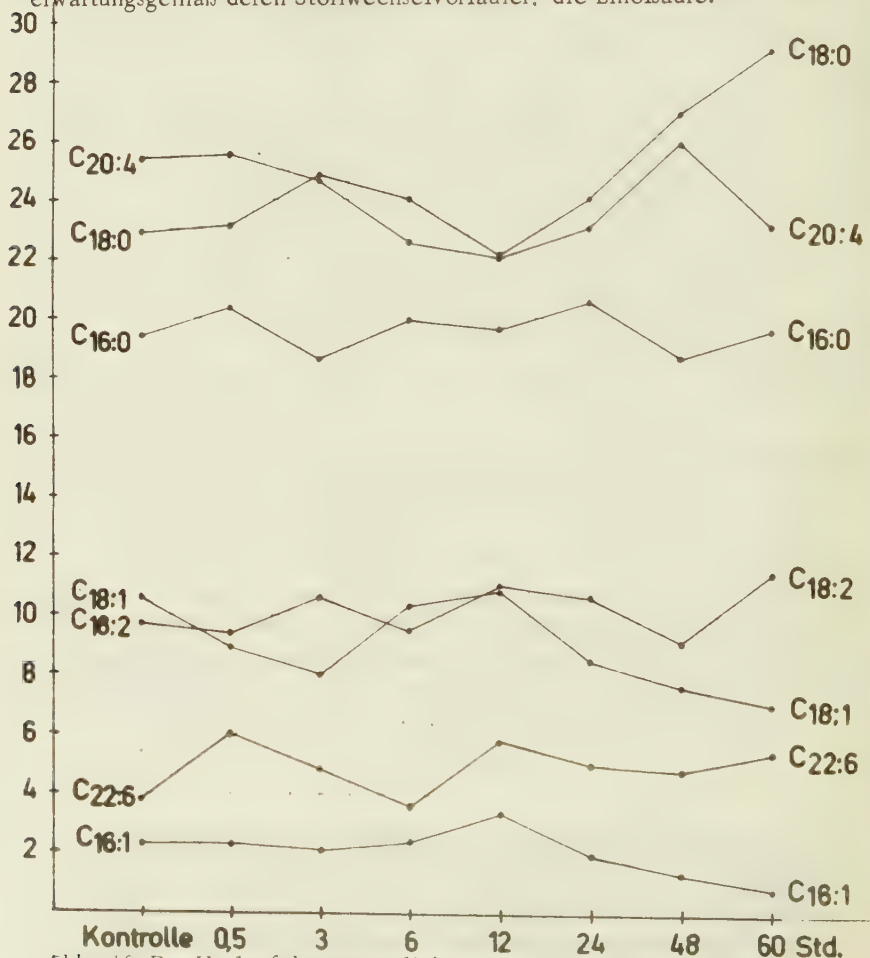


Abb. 10: Der Verlauf der wesentlichen Anteile des Phosphatidfettsäuregemisches. (Graphische Darstellung der Tab. V).

Um diese Befunde zu sichern, wurden die Phosphatidfettsäuren nach Alkaliisomerisierung uv-spektroskopisch untersucht. Hier wurden ausschließlich die mehrfach ungesättigten Fettsäuren nach der Anzahl ihrer Doppelbindungen erfaßt (siehe Tab. VI bzw. Abb. 12)

Tab. VI: Der uv-spektroskopisch ermittelte Polyensäuregehalt der Lebergesamtposphatidfettsäuren. Die Angaben geben die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Zeit nach Bestrahlungs- ende	Diensäuren	Triensäuren	Tetraensäuren	Pentaensäuren	Hexaensäuren
Kontrollgruppe	5,72 ± 0,52		19,06 ± 0,53	1,71 ± 0,33	6,40 ± 0,59
0,5 Std.	6,50 ± 0,21	1,49 ± 0,16	18,12 ± 0,54	1,93 ± 0,06	3,67 ± 0,34
3 Std.	6,84 ± 0,27	1,27 ± 0,14	18,09 ± 0,46	1,40 ± 0,17	5,58 ± 0,81
6 Std.	7,17 ± 0,20	1,28 ± 0,06	14,55 ± 0,77	1,89 ± 0,11	3,08 ± 0,10
12 Std.	7,70 ± 0,17	1,56 ± 0,16	15,53 ± 1,38	1,15 ± 0,12	4,90 ± 0,68
24 Std.	6,84 ± 0,12	1,22 ± 0,19	17,60 ± 0,76	0,91 ± 0,11	7,42 ± 0,47
48 Std.	6,27 ± 0,18	1,11 ± 0,08	20,25 ± 1,29	1,58 ± 0,16	4,91 ± 0,40
60 Std. †	8,51 ± 0,23	1,36 ± 0,10	19,51 ± 0,89	1,40 ± 0,11	6,94 ± 0,45

Der Tetraensäuregehalt fiel in den ersten drei Stunden nur geringfügig, zwischen der dritten und sechsten Stunde aber stärker um insgesamt etwa ein Viertel des Kontrollwertes ab. Im folgenden Anstieg war 48 Stunden nach der Bestrahlung die Ausgangslage wieder erreicht. Etwa gleichsinnig wie die Tetraensäure verhielt sich die Hexaensäure, in gewisser Weise gegensinnig der Diensäuregehalt. In erster Annäherung sind die Tetraensäurekonzentration der Arachidonsäurekonzentration, die Hexaensäurekonzentration der Dokosahexensäurekonzentration und die Diensäurekonzentration der Linolsäurekonzentration gleichzusetzen.

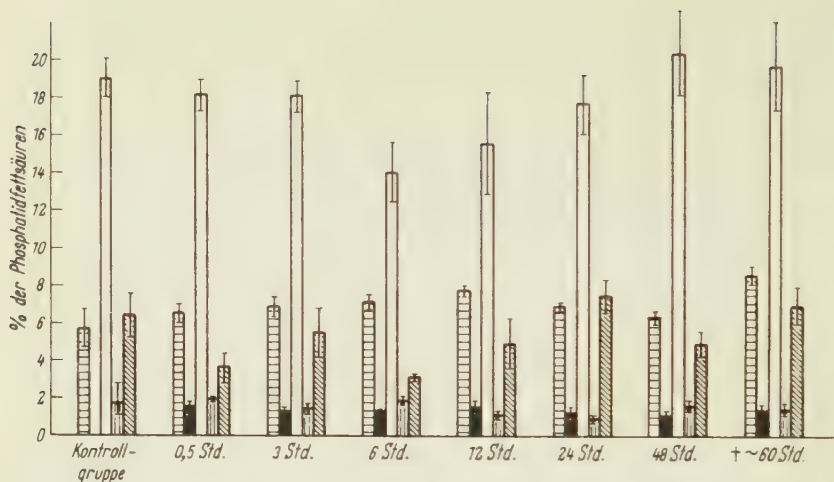


Abb. 11: Die spektroskopisch ermittelte Konzentration der Dien-säure (quer schraffiert), Triensäure (schwarz), Tetraensäure (weiß), Pentaensäure (längs schraffiert) und Hexaensäure (schräg schraffiert) in der Leber, bezogen auf den Gehalt an Phosphatidfettsäuren mit Angabe der einfachen Standardabweichungen.

Diese vor allem hinsichtlich der Arachidonsäurekonzentration stattfindenden Verschiebungen des Fettsäuremusters im Verlauf der Strahlenkrankheit lassen sich in Beziehung zur strahlenbedingten Einschränkung einer Teilfunktion der Leberzelle bringen. HALL und Mitarbeiter (30) hatten nämlich das Ausmaß der oxydativen Phosphorylierung in den Lebermitochondrien im Anschluß an eine ähnliche GKB untersucht. Dabei hatte sich 6 bis 12 Stunden nach der Bestrahlung eine Beeinträchtigung dieses Stoffwechselprozesses um 25 % ergeben. In diesem Zeitraum war im vorliegenden Falle die Tetraensäurekonzentration um einen ähnlichen Betrag gesunken. Einen Tag nach dem Insult erreichten beide Werte wieder übereinstimmend die gleiche Höhe. Die Phosphatide sind nun u. a. auch in den Mitochondrien wichtige Membranbestandteile und hier direkt am Elektronentransport bei der oxydativen Phosphorylierung beteiligt. Bei diesem im einzelnen noch unbekannten Mechanismus kommt den in den Phosphatidmolekülen gebundenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren eine entscheidende Bedeutung zu (Übersicht bei 17).

Der anfängliche Abfall der Arachidonsäurekonzentration läßt sich in der Weise deuten, daß diese mehrfach ungesättigte Fettsäure als Bestrah-

lungsfolge in einem gewissen Umfang selbst im Sinne einer Oxydation verändert wird. In vitro-Versuche haben gezeigt, daß diese Substanzen geeignete Reaktionspartner für die bei der Bestrahlung auftretenden Radikale sind und dementsprechend leicht zu den sog. Lipoperoxyden verändert werden. Derartige Lipoperoxyde ließen sich wiederholt in verschiedenen Organen von Ratten und Mäusen nach einer Strahleneinwirkung in erhöhten Konzentrationen nachweisen (13). Sie sind jedoch toxische Stoffe, indem sie z. B. Fermente inaktivieren (12) und auch andere Eiweißkörper denaturieren können (11), und werden wahrscheinlich als Zellgifte eliminiert. Als Folge derartiger Reaktionen muß ein Abfall der arachidonsäurehaltigen Phosphatide erfolgen. Da es sich bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Überzahl um essentielle Verbindungen oder um unmittelbare Abkömmlinge derartiger Verbindungen handelt, die in der Zelle nur in begrenzter Menge zur Verfügung stehen, dürfte in diesem Zeitraum ein relativer Mangel an Arachidonsäure im Gewebe entstehen. Ersatzweise werden andere, weniger ungesättigte Fettsäuren in die Phosphatide eingebaut. Über eine vermehrte Phosphatidsynthese während der ersten 6 Stunden nach einer GKB ist unter Verwendung von ^{14}C -markiertem Acetat und ^{32}P -markiertem Phosphat wiederholt berichtet worden. Dieser verminderte Arachidonsäuregehalt dürfte die Ursache für die von HALL und Mitarbeiter berichtete Beeinträchtigung der oxydativen Phosphorylierung sein. Es wäre natürlich aber auch denkbar, daß auch die unter der Bestrahlung aus den Phosphatidfettsäuren gebildeten Lipoperoxyde ihrerseits eine Beeinträchtigung dieser Funktionen bewirken.

Im Laufe der nächsten 24 Stunden gelingt es dann durch Mobilisation aus anderen Quellen bzw. durch Kettenverlängerung und Dehydrierung ihrer Stoffwechselvorläufer ausreichende Mengen Arachidonsäure zum Ersatz der nichtarachidonsäurehaltigen, stoffwechselmäßig inaktiven Phosphatide bereitzustellen, um vollwertige arachidonsäurehaltige Moleküle wieder aufzubauen. Als Folge hat sich 24 bis 48 Stunden nach der Bestrahlung zugleich mit den enzymatischen Leistungen der membranösen Leberstrukturen auch die Fettsäurezusammensetzung der Gesamtphosphatide wieder normalisiert.

Sicher ist die oxydative Phosphorylierung nicht die einzige Zellfunktion, in die die Phosphatide aktiv eingeschaltet sind. Da aber hierüber in der Literatur in Verbindung mit einer GKB keine Untersuchungen vorliegen, können die diskutierten Zusammenhänge zwischen Strahleneinwirkung, oxydativer Phosphorylierung, Zusammensetzung der Phosphatide und ihre Fettsäuren nur spekulativ verallgemeinert werden.

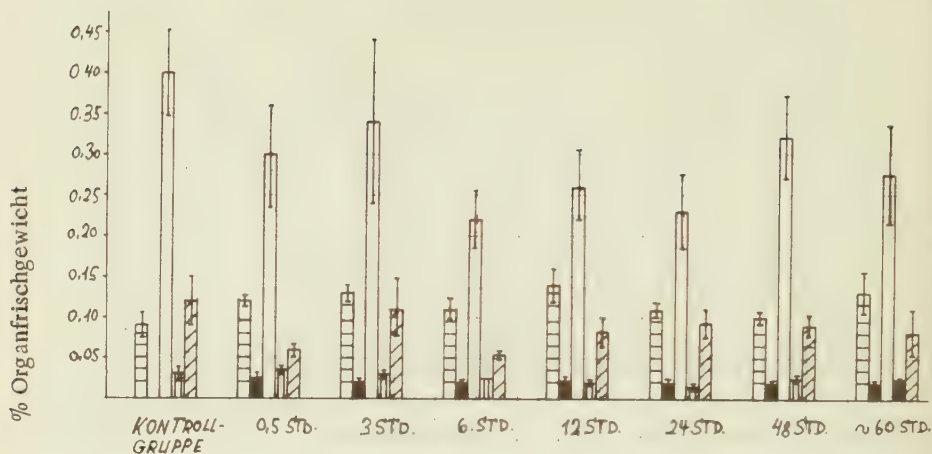


Abb. 12: Die Polyenfettsäurekonzentrationen, bezogen auf das Organfrischgewicht. Kennzeichnung: Diensäuren (quer schraffiert), Triensäuren (schwarz), Tetraensäuren (weiß), Pentaensäuren (längs schraffiert) und Hexaensäuren (schräg schraffiert). Der Bereich der einfachen Standardabweichung ist am Säulenkopf angegeben.

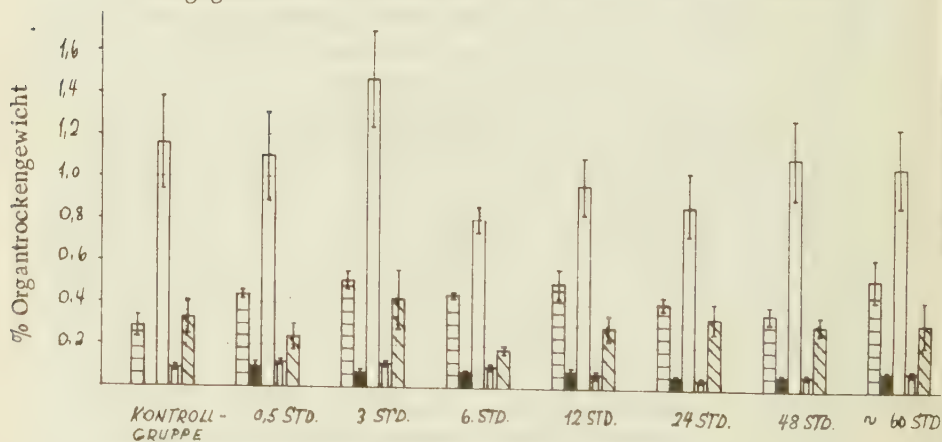


Abb. 13: Die Polyenfettsäurekonzentrationen, bezogen auf das Organtrockengewicht. Die Kennzeichnung der Säulen und die Angabe der Standardabweichung entspricht Abb. 12.

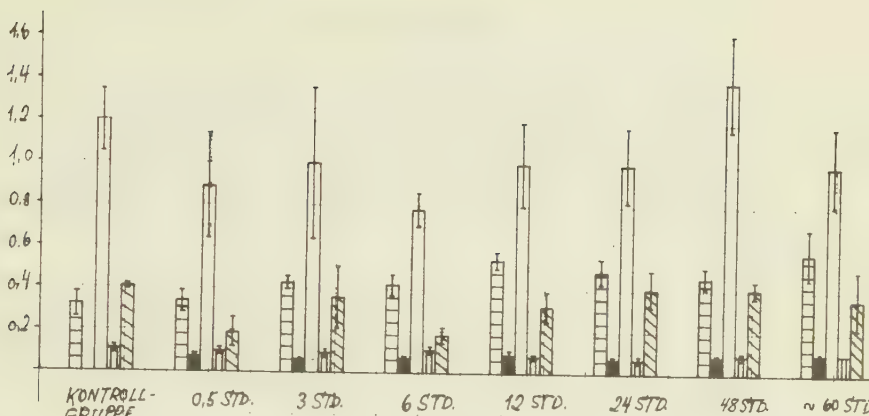


Abb. 14: Die Polyenfettsäurekonzentrationen, bezogen auf das Körpergewicht. Die Kennzeichnung der Säulen und die Angabe der Standardabweichung entspricht der Abb. 12.

Eine Frage, die sich aus den beschriebenen Verschiebungen des Fettsäuremusters ergibt und die nicht im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen beantwortet werden konnte, ist die, ob die Veränderungen in der Arachidonsäurekonzentration durch Veränderungen in der Phosphatidzusammensetzung zustande kam oder ob tatsächlich - wie zeitweise im Vorstehenden diskutiert - die in den Glycerinphosphatiden β -ständig gebunden, mehrfach ungesättigten Fettsäuren infolge stattgefundener Peroxydierung gegen gesättigte oder einfach ungesättigte ausgetauscht wurden. Der Beantwortung dieser Frage muß deswegen Bedeutung beigemessen werden, da eine Änderung in der Phosphatidzusammensetzung eigentlich auch zu einer Änderung in der Membranstruktur und damit zu einer Änderung der Membraneigenschaften und -funktionen führen sollte.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Sprague-Dawley-Ratten wurden mit 1500r ganzkörperbestrahlt. Körper- und Lebergewicht, sowie der Gehalt an Neutralfetten und Phosphatiden und die Zusammensetzung der Phosphatidfettsäuren wurden 0,5, 3, 6, 12, 24, 48 und 60 Stunden nach Bestrahlungsende bestimmt.
2. Das Körpergewicht der Tiere zeigte eine fast gleichmäßige Abnahme von einem Mittel von 236 g der Kontrolltiere auf 190 g der an der akuten Strahlenkrankheit ad exitum gekommenen Tiere. Dies dürfte durch die Einstellung der Nahrungsaufnahme und durch Austrocknung (Resorptionsstörung) bedingt sein.
3. Das Leberfrischgewicht zeigte einen relativen Anstieg, der in den ersten drei Stunden durch einen verstärkten Wassereinstrom in das Organ bestimmt ist. Der extrahierte Geweberückstand blieb konstant, d. h. während der gesamten Beobachtungsdauer war kein wesentlicher Parenchymschwund festzustellen. Unverändert blieben ebenfalls die wasserlöslichen Extraktstoffe.
4. Der Gesamtlipoidgehalt der Leber zeigte einen Verlauf, der durch die starke Abnahme der Neutralfette bis zu 6 Stunden p. irr. bedingt war. Der Phosphatidgehalt änderte sich nicht wesentlich.
5. Bei den Phosphatidfettsäuren zeigten sich nur bezüglich der mehrfach ungesättigten strahlungsbedingte Veränderungen. Die Arachidonsäurekonzentration fiel auf ein Minimum bei 6 Stunden ab, ebenso die Dokosahexaensäure. Ca. 48 Stunden nach Bestrahlungsende waren die Ausgangswerte wieder erreicht.
6. Als kritischer Zeitpunkt nach dem Strahleninsult erwies sich der 6-Stunden-Wert, bei dem fast alle veränderten Konzentrationen ihre Minima erreichten. Nach 48 bis 60 Stunden kehrten viele Werte zur Norm zurück.
7. Durch Synthesesteigerung scheint die Leber in der Lage zu sein, den Verlust an strahlungsgeschädigten Phosphatiden und ihren Fettsäuren wieder auszugleichen.
8. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit den in der Literatur mitgeteilten Befunden diskutiert.

24	235	8,87	2,322	1,754	0,157	0,410	0,120	0,245	0,157	8,05	0,95	15,97	1,52	3,85	30,34
	245	9,98	2,831	2,159	0,158	0,512	0,234	0,267	0,181	7,45	1,15	14,52	1,30	3,72	28,14
	210	9,40	2,565	2,131	0,115	0,319	0,119	0,179	0,118	6,60	0,87	17,15	0,90	8,52	34,04
	240	10,39	2,642	2,067	0,169	0,406	0,125	0,188	0,126	9,42	1,75	15,67	0,67	6,22	33,73
	190	7,61	2,152	1,659	0,085	0,407	0,159	0,202	0,115	6,98	0,55	19,17	1,60	7,60	35,90
48	210	9,54	2,609	2,176	0,106	0,326	0,082	0,234	0,147	8,17	1,02	18,42	0,87	7,37	35,85
	205	8,61	2,561	1,991	0,110	0,459	0,125	0,227	0,149	6,95	1,25	13,70	1,22	4,25	27,37
	190	8,71	2,608	1,920	0,112	0,575	0,317	0,227	0,152	5,95	1,12	14,72	1,35	4,67	27,81
	190	8,53	2,625	1,856	0,288	0,479	0,125	0,190	0,125	6,65	0,07	22,60	1,70	6,75	37,77
	235	10,51	2,905	2,289	0,134	0,482	0,104	0,325	0,189	6,52	0,87	20,05	1,27	5,72	34,43
~ 60	215	8,93	2,386	1,745	0,147	0,493	0,224	0,245	0,176	4,82	1,20	5,55	0,82	1,45	13,84
	190	8,54	2,514	1,836	0,110	0,568	0,289	0,286	0,167	5,97	1,25	18,12	2,00	4,35	31,69
	205	8,03	2,104	1,759	0,086	0,259	0,056	0,171	0,122	8,48	0,62	20,60	1,90	5,90	37,50
	175	7,38	1,911	1,568	0,079	0,263	0,046	0,213	0,139	8,82	1,37	15,47	0,42	9,05	35,13
	205	9,11	2,461	1,961	0,104	0,396	0,082	0,290	0,192	8,23	1,00	9,00	1,00	2,60	21,83
	195	9,95	2,698	2,294	0,096	0,308	0,071	0,256	0,155	7,82	1,32	14,35	0,55	7,07	31,11
	190	8,27	2,168	1,738	0,072	0,357	0,058	0,253	0,178	5,08	0,55	23,27	1,27	7,95	38,12
	190	8,23	2,175	1,761	0,086	0,327	0,052	0,264	0,153	4,90	1,67	10,25	1,17	3,17	21,16
	170	7,18	1,733	1,384	0,090	0,247	0,056	0,177	0,116	9,20	1,75	12,45	1,37	3,32	28,09
	185	7,96	2,000	1,626	0,077	0,297	0,068	0,209	0,129	6,35	2,52	19,75	0,67	7,90	37,19
	190	7,11	1,878	1,543	0,068	0,265	0,045	0,216	0,130	13,97	1,02	16,97	1,75	5,90	39,61
~ 60	205	9,12	2,396	2,012	0,083	0,300	0,044	0,245	0,163	4,18	1,45	26,05	1,35	10,97	43,70

Als wasserlösliche Extraktstoffe ist der Verdampfungsrückstand der oberen Phase bei der Verteilung nach Folch u. Mitarb. () bezeichnet.

Als Gesamtlipide ist der Verdampfungsrückstand der unteren Phase bei der Folch-Verteilung bezeichnet.

	Stundenwert														
Kontrollgruppe	Körpergewicht g	Organfrischgewicht g	Organtrockengewicht g	Extrahierter Geweberückstand g	Wasserlösliche Extraktstoffe g	Gesamtlipoide g	Neutralfette g	Phosphatide g	Phosphatidfettsäure g	Diensäuregehalt %	Triensäuregehalt %	Tetraensäuregehalt %	Pentaensäuregehalt %	Hexaensäuregehalt %	Gesamtpolyenfettsäuren %
	230	7,00	4,176	3,433	0,091	0,651	0,393	0,249	0,167	7,13	0,10	19,65	1,90	7,72	36,50
	265	9,37	2,882	2,083	0,137	0,661	0,377	0,294	0,192	5,72	0,025	17,77	1,07	7,02	31,60
	235	8,46	2,658	1,865	0,151	0,641	0,415	0,208	0,137	5,47	0,85	17,17	1,62	5,10	30,21
	255	8,09	2,470	1,781	0,117	0,572	0,272	0,301	0,174	4,59	0,30	20,17	1,45	5,77	32,28
0,5	205	7,90	2,418	1,618	0,121	0,678	0,431	0,248	0,150	3,78	1,15	18,67	1,87	4,52	29,99
	225	7,15	2,035	1,572	0,123	0,340	0,127	0,200	0,134	7,15	1,42	15,37	1,90	3,72	29,56
	230	5,52	1,503	1,154	0,066	0,282	0,118	0,145	0,101	6,85	1,57	13,07	1,95	3,22	26,66
	210	6,46	1,821	1,324	0,089	0,406	0,167	0,192	0,135	5,92	0,65	18,67	2,10	4,77	32,11
	250	5,77	1,600	1,256	0,071	0,272	0,047	0,213	0,114	6,22	1,90	8,10	0,72	2,70	19,64
3	230	6,85	1,824	1,327	0,090	0,405	0,188	0,186	0,119	6,37	1,10	17,57	1,77	3,95	30,76
	200	6,72	1,789	1,326	0,070	0,392	0,156	0,204	0,141	6,92	1,22	22,15	1,82	8,42	40,53
	248	7,83	1,972	1,596	0,103	0,273	0,084	0,143	0,100	9,72	1,22	17,15	0,95	7,07	36,11
	237	6,81	1,773	1,374	0,082	0,316	0,083	0,203	0,137	7,45	0,47	18,57	1,42	4,47	32,38
	230	7,96	1,901	1,503	0,154	0,243	0,087	0,137	0,083	6,10	1,67	9,57	0,80	2,07	20,21
6	208	7,05	1,943	1,364	0,059	0,519	0,286	0,215	0,135	6,90	0,97	18,57	1,42	5,40	33,26
	250	8,80	2,321	1,770	0,145	0,405	0,119	0,225	0,154	7,05	0,90	12,15	1,40	3,10	24,60
	240	9,48	2,580	2,052	0,141	0,387	0,101	0,269	0,169	6,90	1,30	15,70	2,00	3,32	29,22
	235	8,85	2,385	1,847	0,144	0,393	0,107	0,227	0,140	5,97	1,42	14,90	2,02	3,10	27,41
	200	8,01	1,954	1,590	0,095	0,268	0,062	0,178	0,114	7,57	1,12	13,05	1,65	2,80	26,19
19	195	7,60	2,184	1,771	0,116	0,297	0,086	0,192	0,125	7,62	1,57	19,12	1,10	6,55	35,69
	230	8,08	2,331	1,904	0,081	0,345	0,069	0,231	0,148	9,40	1,95	12,52	1,12	5,50	30,62
	220	7,84	2,325	1,747	0,133	0,444	0,165	0,237	0,128	4,70	1,57	4,75	0,75	1,22	12,99

Die vorliegende Arbeit wurde im Isotopenlabor der Medizinischen Poliklinik der Universität München unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. D. EBERHAGEN ausgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. SEITZ, Direktor der Medizinischen Poliklinik der Universität München, für die Überlassung des Themas und Herrn Professor Dr. N. ZÖLLNER, der sich darum bemühte, daß die Untersuchungen durch Mittel des Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung ermöglicht wurden.

Mein sehr herzlicher Dank meinem "Doktorvater", Herrn Priv.-Doz. Dr. med. D. EBERHAGEN, für seine sehr freundliche und lehrreiche Hilfe bei der Durchführung der Versuche und bei der Korrektur der Arbeit.

Mein Dank auch ungenannt allen anderen, die mich in der einen oder anderen Weise unterstützt haben.

LITERATUR

- 1) M. ERRERA u. A. FORSSBERG: Mechanism in Radiobiology
Vol. II, S. 237, New York - London 1960
- 2) W. MINDER: Strahlenbiologische Primäreffekte in heutiger Sicht. -
Tagungsbericht der gemeinsamen Tagung der Deutschen Gesellschaft
für Biophysik e.V., der Österreichischen Gesellschaft für reine und
angewandte Biophysik und der Schweizerischen Gesellschaft für
Strahlenbiologie, Wien 14. - 16. September 1964 - 38. Beitrag,
S. 161 - 174, Metapress Wien
- 3) V.V. NIKOLSKY, N.A. NEKOVALEVA, L.M. CHUMAKOVA: Med.
Radiol. (Moskau) 5, (12), 13 (1960) - Ref. Zentr. ges. Radiol. 69,
13 (1961)
- 4) D. EBERHAGEN, I. KLEMPAY, N. ZÖLLNER: Strahlentherapie,
Band 126, Heft 1 (1965).
- 5) K. TÄUFEL, R. ZIMMERMANN, R. HUBER: Naturwissenschaften 47,
(1960) 355
- 6) MEAD, J.F.: Science 115 (1952) S. 470
- 7) HNC-PING PAN, S.A. GOLDBLITH und B.E. PROCTOR: J. Amer.
Oil Chem. Soc. 35 (1958) 1
- 8) HOWTON, D.R.: Radiat. Res. 20 (1963): 161
- 9) H. LÜCK, R. KOHN: Experimentia 17, 109 (1961)
- 10) WEISS, J.: Nature, 153 (1944): 748
- 11) T. NISHIDA, F.A. KUMMEROW: J. Lipid. Res. 1 (1960) 450
- 12) M.E. CLUBB, E.D. WILLS: Biochem. J. 71 (1959) 16
- 13) HORGAN, V.J. und J. St. L. PHILPOT: Brit. J. Radiol. (M.S.)
27 (1954): 63
- 14) G.S. GETZ, W. BARTLEY, F. STRIPE, B.M. NOTTON,
A. RENSHAW: Biochem. J. 83 (1962) 181
- 15) G.B. BRIELEY, A.J. MEROLA: Biochem. Biophys. Acta 64, (1962)
205
- 16) G.B. BRISLEY, A.J. Merola, S. FLEISCHER: Biochem. Biophys.
Acta 64 (1962) 218

- 17) G. B. ANSELL, J. M. HAWTHORNE: Phospholipids; Chemistry, Metabolism and Function. - Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1964
- 18) M. ERRERA u. A. FORSSBERG: Mechanism in Radiobiology, S. 255, Vol. II, New York - London; Ref. 1 der Tab.: A. RENSCHAW: Biochem. J. 83 (1962) 181. Ref. 2 der Tab.: M. G. MACFARLANE, G. M. GRAY, L. W. WHELLEDON: Biochem. J. 77 (1960) 626
- 19) G. V. MARINETTI, I. ERBLAND, I. KOCHEN, E. STOTZ: J. Biol. Chem. 233 (1958) 740
- 20) P. JURTSCHUK, jr., I. SEKUZZU, D. E. GREEN: Biochem. Biophys. Res. Commun. 6 (1961) 76
- 21) D. E. GREEN, S. FLEISCHER: Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 70 (1963) 544
- 22) A. GREGL: Strahlentherapie Sonderband 46, 239 (1960) - Ref. Zentr. ges. Radiol. 69, 117 (1961)
- 23) M. MAQSOOD, I. K. ASHIKAWA: Int. J. Rad. Biol. 4, 5, 521-532, Ref. Zentr. ges. Radiol. 74, 234 (1962)
- 24) I. CHEYMOL, M. ADOLPHE, F. HEITZ: Bull. Acad. Nat. Med. (Paris) Sér. 3, 145, 518 (1961)
- 25) H. BRAUN: Strahlentherapie 117, 134 (1962)
- 26) H. BRAUN, I. MÜLLER: Naturw. 48, 679 (1961)
- 27) K. L. JACKSON, C. ENTERMANN: USNRDL TR- 504 (1961) - Nuclear Science Abstracts 15 (1961) Nr. 17933
- 28) J. F. THOMSON, Y. E. RAHMAN: Rad. Res. 17, 573 (1962)
- 29) H. RYSER, H. AEBI, A. RUPPINGER: Experimentia 10, 304 (1954)
- 30) I. C. HALL, A. L. GOLDSTEIN, B. P. SONNBLICK: J. Biol. Chem. 238 (1963) 1137
- 31) H. RYSER, B. SCHMIDLI, A. ZUPPINGER, H. AEBI: Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta 13, 270 (1955)
- 32) M. HÖFERT: Angew. Chemie 76, 826 (1964)
- 33) B. N. TARUSOV, A. I. POLIDOVA, A. I. ZHURAVLEV: Radiobiologiya, 150 (1961) - Nuclear Sciences Abstracts 16 (1962) Nr. 1496

- 34) N. ZÖLLNER, D. EBERHAGEN: Untersuchungen und Bestimmung der Lipoide im Blut. - Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1965, S. 35
- 35) N. ZÖLLNER, D. EBERHAGEN: Untersuchungen und Bestimmung der Lipoide im Blut. - Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1965, S. 42 - 44
- 36) BOLDINGH, J.: Rec. trav. chim. Pays-Bas Belg. 69, 247 (1950)
- 37) WOODFORD, F.P., C.M. van GEMT: J. Lip. Pos. 1, 188, (1960)
- 38) F. LEUPOLD, D. EBERHAGEN: Klin. Wochenschrift, Jahrgang 36, Heft 10, S. 484 - 486
- 39) A.S. KAINOVA: Biochemistry (U.S.S.R.) 25, 415 (1960) - Nucl. Sci. Abstr. 15 (1961) Nr. 10703
- 40) J.G. CONIGLIO, W.I. DARBY, I.A. EFNER, I. FLEMING, G.W. HUDSON: LA - 2179, Jan., 46 (1957)
- 41) R.G. GOULD, V.L. BELL, E.H. LILLY, P. KEEGAN, I. van PIPER, M.L. JONNARD: Am. J. Physiol. 196, 1231 (1959)
- 42) H. SUPPLEE, O.E. WEINMANN, E. ENTENMANN: Am. J. Physiol. 185, 583 (1956)
- 43) N. NORTH, L.F. NIMS: Fed. Proc. 8, 119 (1949)
- 44) M.G. ORD, L.A. STOCKEN in: M. ERRERA u. A. FORSSBERG: Mechanism in Radiobiology, Vol. I, S. 285, New York - London 1960

LEBENS LAUF

Am 26. April 1941 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Ernst Hartung und seiner Frau Erna, geb. Koch, in München geboren.

Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in München-Obermenzing, trat dann in das Realgymnasium Gräfelfing bei München ein, an welchem ich 1960 das Abitur ablegte.

Mit dem Wintersemester 1960/61 begann ich das Studium der Medizin an der Universität München, bestand hier im Herbst 1961 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Frühjahr 1963 die ärztliche Vorprüfung.

Das klinische Studium absolvierte ich an der Universität München und an der Faculté de Médecine der Universität Paris. Nach einem weiteren Studienaufenthalt in Kanada beendete ich mein Studium am 15. Dezember 1966 mit bestandenem Staatsexamen an der Universität München.

